



ETUDE DE LA REGULATION DES RECEPTEURS DE PEPTIDES N-FORMYLES

Emilie Huet Moulard

► To cite this version:

Emilie Huet Moulard. ETUDE DE LA REGULATION DES RECEPTEURS DE PEPTIDES N-FORMYLES. Biologie cellulaire. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2007. Français. NNT : . tel-00154576

HAL Id: tel-00154576

<https://theses.hal.science/tel-00154576>

Submitted on 14 Jun 2007

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THESE

présentée par

Emilie HUET MOULARD

pour obtenir le grade de

DOCTEUR

DE L'UNIVERSITE JOSEPH FOURIER-GRENOBLE I

Discipline : Biologie Cellulaire

soutenue le 5 juin 2007

ETUDE DE LA REGULATION DES RECEPTEURS DE PEPTIDES N-FORMYLES

Directrice de thèse : Dr. Marie-Josèphe RABIET

JURY

Pr.	Françoise Morel	Présidente
Pr.	Oliver Nüße	Rapporteur
Dr.	Ralf Jockers	Rapporteur
Dr.	Eric Reiter	Examineur
Dr.	Marie-Josèphe Rabiet	Examineur

Thèse préparée au Laboratoire de **Biochimie et Biophysique des Systèmes Intégrés**
iRTSV / CEA-Grenoble
dirigé par François Boulay

RESUME

Les cellules phagocytaires (neutrophiles, monocytes et macrophages) constituent la première ligne de défense contre les pathogènes. Leur migration dirigée vers le site infectieux et la libération de leur arsenal antimicrobien et cytotoxique sont l'aboutissement de voies de signalisation intracellulaires sollicitées par la stimulation de récepteurs appelés récepteurs de chimioattractants. Ces récepteurs appartiennent à la famille des récepteurs couplés aux protéines G hétérotrimériques (RCPGs). Après fixation du ligand et transmission du signal par la protéine G hétérotrimérique, les RCPGs sont phosphorylés et interagissent avec les β -arrestines, protéines d'échafaudage qui concourent au processus d'internalisation des récepteurs par la voie des puits mantelés de clathrine. Plusieurs exemples récents suggèrent qu'une signalisation indépendante des protéines G pourrait également être transmise par les β -arrestines et font émerger le concept de macro-complexes de signalisation capables d'assurer la spécificité des réponses cellulaires.

Le travail présenté dans ce mémoire concerne les récepteurs de la famille FPR (Formyl Peptide Receptor) et plus spécialement le récepteur FPRL1 (FPR-like 1).

Des peptides N-formylés dérivant de protéines du pathogène *Listeria monocytogenes* ou de protéines mitochondriales humaines ont été identifiés comme nouveaux agonistes de ces récepteurs. Les sélectivités relatives des différents récepteurs pour les peptides bactériens ou mitochondriaux assignent un rôle prédominant pour le récepteur FPR dans la défense antibactérienne et suggèrent un rôle des récepteurs de la famille FPR dans les phénomènes inflammatoires associés aux dommages tissulaires et aux maladies dégénératives.

La régulation des récepteurs dépend essentiellement de leur phosphorylation et de leur internalisation. Dans cette étude, il a été montré que le récepteur FPRL1 était phosphorylé sur des résidus sérines et thréonines. Pour cartographier les sites de phosphorylation, des mutants de remplacement Ser /Thr en alanine ont été construits par mutagenèse dirigée de la région C-terminale du récepteur. L'étude de leur phosphorylation a permis d'identifier les sites majeurs de phosphorylation. Il a été montré que les β -arrestines interagissent avec le récepteur FPRL1 phosphorylé et qu'elles sont indispensables à son internalisation. Ceci différencie le récepteur FPRL1 du récepteur FPR qui peut être internalisé même en l'absence des β -arrestines.

Par ailleurs, il a été montré par diverses approches (surexpression de formes sauvages ou de "dominants négatifs" des β -arrestines, utilisation de cellules déficientes en β -arrestines et inhibition par la toxine pertussique de la signalisation par les protéines G de type Gi) que l'activation rapide et transitoire des MAP kinases ERK1/2, enclenchée par la stimulation du récepteur FPRL1, est majoritairement dépendante de la protéine G hétérotrimérique et qu'il n'y pas de signalisation transmise par les β -arrestines. Cette propriété, que le récepteur FPRL1 partage avec le récepteur FPR, pourrait être une particularité des récepteurs de chimioattractants qui sont essentiellement couplés à des protéines G de type Gi.

Enfin, une analyse protéomique des complexes multi-protéiques bâtis autour du couple FPRL1/ β -arrestine a été menée. Après purification de la β -arrestine et des protéines associées par la méthode TAP (Tandem Affinity Purification), l'identification par spectrométrie de masse des protéines présentes a permis d'identifier un nouveau partenaire des β -arrestines qui interagirait avec celles-ci après stimulation du récepteur FPRL1. Il s'agit du complexe adaptateur AP3. Son homologue AP2 est impliqué dans l'internalisation par les puits mantelés de clathrine, mais peu de données existent concernant AP3. Une implication dans le trafic endocytaire ou post-endocytaire du récepteur peut être envisagée.

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION

A/ Les phagocytes, première ligne de défense de l'organisme contre les pathogènes.....	1
I- Les phagocytes	1
II- Les fonctions cellulaires du neutrophile.....	3
II-1 Le chimiotactisme ou migration cellulaire dirigée.....	3
II-2 La phagocytose.....	5
II-3 La mobilisation des granules.....	5
II-4 L'explosion respiratoire, la NADPH oxydase.....	7
B/ Les récepteurs de chimioattractants	9
I- Les récepteurs couplés aux protéines G hétérotrimériques	10
II- Les récepteurs chimiotactiques	12
II-1 Description générale des récepteurs de la famille FPR.....	12
II-2 Ligands des récepteurs de la famille FPR	13
II-3 Localisation cellulaire et tissulaire des récepteurs de la famille FPR	15
II-4 Signalisation intracellulaire en aval des récepteurs de chimioattractants	16
II-5 Régulation de l'activité des récepteurs de chimioattractants	19
C/ Les β-arrestines	24
I- Historique	24
I-1 L'arrestine visuelle	24
I-2 Découverte des β -arrestines.....	24
II- Description des β -arrestines	25
II-1 Description générale.....	25
II-2 Caractéristiques des deux isoformes de β -arrestine	27
II-3 Données structurales sur les β -arrestines	29
II-4 Etat oligomérique des β -arrestines	31
III- Fonctions des β -arrestines.....	32
III-1 Découplage du récepteur à la protéine G	33
III-2 Implication dans l'internalisation des récepteurs.....	36
III-3 Implication dans la signalisation, protéines d'échafaudage.....	40
D/ But du travail.....	43

MATERIELS ET METHODES

A/ Biologie Cellulaire et Biochimie	44
I- Lignées et cultures cellulaires.....	44
II- Transfection des cellules	45
II-1 Transfection transitoire	45
II-2 Transfection stable	46
III- Analyses menées sur cellules vivantes	46
III-1 Mobilisation du calcium intracellulaire	46
III-2 Test de chimiotactisme	47
III-3 Dosage de la production d'ions superoxyde	47
III-4 Cytométrie de flux	48
IV- Techniques utilisant l'immunorecognition par des anticorps.....	48
IV-1 Immunofluorescence.....	48

IV-2 Immunoprécipitation.....	50
IV-3 Immunodétection après électrophorèse et électrotransfert	50
V- Préparation d'extraits cellulaires.....	51
V-1 Cinétique d'activation des MAP-kinases ERK1/2.....	51
V-2 Purification de complexes par affinité en tandem.....	52
V-3 Préparation membrane/cytosol.....	53
VI- Manipulations effectuées avec du matériel radioactif	53
VI-1 Phosphorylation du récepteur après marquage métabolique avec l'acide orthophosphorique [³² P]	53
VI-2 Analyse des acides aminés phosphorylés	53
VI-3 Iodation du peptide WKYVMV.....	54
VI-4 Liaison de ligand radioactif	54
VI-5 Séquestration de ligand radioactif	55
B/ Biologie Moléculaire.....	55
I- Méthodologies	55
I-1 Préparation d'ADN plasmidique	55
I-2 Réaction en chaîne par polymérase, PCR.....	56
I-3 Purification des fragments d'ADN	56
I-4 Mutagenèse dirigée (Kit QuickChange® de Stratagene)	56
I-5 Hybridation des oligonucléotides	57
I-6 Ligation et transformation par choc thermique	57
II- Matériels.....	57
III- Constructions plasmidiques	59
III-1 Vecteurs d'expression de la β -arrestine 1 mutée sur le site polyproline	59
III-2 Vecteurs d'expression du récepteur FPRL1 et de ses mutants de phosphorylation	59
III-3 Vecteurs d'expression basés sur le système TAP	61
RESULTATS ET DISCUSSIONS	
A/ Identification de nouveaux agonistes des récepteurs de la famille FPR.....	65
I- Identification de nouveaux peptides N-formylés induisant la signalisation intracellulaire par stimulation des récepteurs de la famille FPR.....	67
I-1 Mobilisation du calcium intracellulaire.....	67
I-2 Signalisation vers les MAP kinases.....	70
II- Capacité des agonistes nouvellement identifiés à induire des réponses cellulaires telles que le chimiotactisme et la génération d'ions superoxyde.....	72
II-1 Capacité du peptide d'origine mitochondriale f-MMYALF à induire le chimiotactisme des cellules HL-60 exprimant FPRL1 ou FPRL2	72
II-2 Capacité des agonistes f-MMYALF et f-MIVIL à entraîner la génération d'ions superoxyde par la NADPH oxydase dans les cellules HL-60 différenciées	73
III- Discussion et conclusions	75
B/ Rôle des β-arrestines dans les voies de signalisation initiées par les récepteurs de chimioattractants.....	78
I- Etude du rôle de l'interaction entre la β -arrestine 1 et la tyrosine kinase c-Src dans les cellules myéloïdes HL-60.....	79
I-1 Etablissement d'une lignée HL60 exprimant de façon inductible la β -arrestine 1 sauvage ou mutée sur les motifs impliqués dans son interaction avec la tyrosine kinase c-Src	79
I-2 Effet de l'expression du double mutant P91G-P121E de la β -arrestine 1 sur la production d'ions superoxyde	82

II- Etude du rôle des β -arrestines dans la signalisation vers les MAP kinases suite à la stimulation du récepteur FPRL1	84
II-1 Effet de la surexpression des β -arrestines	84
II-2 Effet de l'absence des β -arrestines	86
II-3 Effet de l'inhibition de la voie dépendante des protéines Gi	88
II-4 Discussions	91
C/ Etude de la régulation des récepteurs des peptides N-formylés : phosphorylation et internalisation	92
I- Phosphorylation	92
I-1 Etude des sites de phosphorylation du récepteur FPRL1	92
I-2 Etude de la phosphorylation de chimères des récepteurs FPRL1 et FPRL2	98
II- Etude du rôle des β -arrestines dans l'internalisation du récepteur FPRL1	101
II-1 Etude de l'association des β -arrestines avec le récepteur FPRL1	101
II-2 Etude du rôle des β -arrestines dans l'internalisation du récepteur FPRL1	102
II-3 Discussion	104
D/ Etude protéomique globale des complexes formés autour du couple "récepteur FPRL1 / β-arrestine"	106
I- Purification des complexes par la méthode TAP (Tandem Affinity Purification)	106
II- Vecteurs d'expression	109
III- La purification par affinité en tandem appliquée aux β -arrestines	110
III-1 Mise au point de la purification par la méthode TAP	110
III-2 Etablissement des lignées cellulaires stables exprimant les β -arrestines fusionnées à l'étiquette TAP en vue de l'étude protéomique	111
III-3 Résultats de l'étude protéomique menée sur les β -arrestines étiquetées TAP	113
III-4 Etude de l'interaction entre les β -arrestines et AP3	120
III-5 Discussions et perspectives sur l'étude protéomique menée sur les β -arrestines	125
IV- La méthode TAP appliquée au récepteur FPRL1	127
IV-1 Etablissement de lignées cellulaires stables exprimant FPRL1-TAP	127
IV-2 Résultats	128
IV-3 Perspectives	132
DISCUSSION GENERALE	135
BIBLIOGRAPHIE	138
ANNEXES	
Annexe A : Inhibition sélective et inductible de l'expression d'une protéine	156
Annexe B : Résultats complets des analyses protéomiques	162
Annexe C : Article Rabiet et al. (2005) Human mitochondria-derived N-formylated peptides are novel agonists equally active on FPR and FPRL1, while <i>Listeria monocytogenes</i> -derived peptides preferentially activate FPR. <i>Eur. J. Immunol.</i> , 35 , 2486-2495	
Annexe D : Revue Rabiet et al. (2007) The N-formyl peptide receptors and the anaphylatoxin C5a receptors : an overview. <i>Biochimie, In Press</i>	
Annexe E : Article Huet et al. (2007) The role of beta-arrestins in the formyl peptide receptor-like 1 internalization and signaling, <i>Cellular Signaling, In Press</i>	

TABLE DES FIGURES

Figure 1 : Polynucléaire neutrophile entouré de globules rouges après coloration au May-Grünwald-Giesma	1
Figure 2 : Schématisation de l'hématopoïèse.....	2
Figure 3 : Migration du neutrophile vers le site inflammatoire	3
Figure 4 : Polarisation d'un neutrophile.....	4
Figure 5 : Phagocytose de <i>candida albicans</i> par un polynucléaire neutrophile.....	5
Figure 6 : Schématisation de la dégranulation du neutrophile	6
Figure 7 : Schématisation de l'assemblage du complexe NADPH oxydase phagocytaire	7
Figure 8 : Schématisation de la notion de récepteur membranaire spécifique.....	9
Figure 9 : Représentation schématique d'un RCPG dans la membrane plasmique	10
Figure 10 : Cycle d'activation des protéines G hétérotrimériques.....	11
Figure 11 : Représentation schématique des voies de signalisation enclenchées par les récepteurs de chimioattractants	17
Figure 12 : Représentation schématique du trafic régulé des récepteurs de chimioattractants	20
Figure 13 : Alignement des domaines C-terminaux de récepteurs de chimioattractants	21
Figure 14 : Alignement de protéines de la famille "arrestine"	26
Figure 15 : Identité des membres de la famille des arrestines humaines	27
Figure 16 : Alignement des deux isoformes de β -arrestines humaines.....	27
Figure 17 : Structure de la β -arrestine 1 bovine, diagramme en ruban.....	29
Figure 18 : Carte de densité électronique du corps polaire de la β -arrestine 1 bovine	29
Figure 19 : Modèle structural des changements conformationnels de la β -arrestine 2 suite à l'activation par un RCPG phosphorylé	31
Figure 20 : Homologies entre les arrestines et les protéines G	34
Figure 21 : Structure de la β -arrestine 2 présentant quelques uns de ses sites d'interaction ...	37
Figure 22 : Schématisation des interactions protéiques impliquant la β -arrestine et des composants de la machinerie d'endocytose	39
Figure 23 : Stratégie de biologie moléculaire pour l'obtention des mutants de FPRL1	60
Figure 24 : Schématisation des vecteurs d'expression basés sur la méthode TAP	63
Figure 25 : Suivi de fluorescence type lors d'un test de mobilisation calcique au Fura2.....	68
Figure 26 : Courbes dose-réponse de la mobilisation de calcium intracellulaire dans les cellules HL-60 exprimant FPR, FPRL1 ou FPRL2.....	69
Figure 27 : Activation des MAP kinases dans les cellules HL-60 exprimant FPR, FPRL1 ou FPRL2	71
Figure 28 : Chambre de chimiotactisme	72
Figure 29 : Activité chimiotactique du peptide mitochondrial f-MMYALF dans les cellules HL-60 non différenciées exprimant FPRL1 ou FPRL2	73
Figure 30 : Activité NADPH oxydase dans des cellules HL-60 différenciées	74
Figure 31 : Schématisation d'une voie de signalisation initiée par les chimioattractants, implication éventuelle des β -arrestines	78
Figure 32 : Système inductible régulé par la tétracycline	80
Figure 33 : Plasmides permettant l'expression de la protéine de fusion β -arrestine 1-EGFP .	81
Figure 34 : Analyse de l'expression et de la répression des protéines de fusion par cytométrie de flux.....	81

Figure 35 : Analyse de la production d'ions superoxyde dans les cellules HL-60-tTA exprimant ou non la protéine de fusion β -arrestine 1-EGFP ou le mutant	82
Figure 36 : Cinétique d'activation des MAP kinases dans les cellules HEK-293-FPRL1 surexprimant ou non les β -arrestines	85
Figure 37 : Effet de petits ARN interférents ciblant les β -arrestines sur la cinétique d'activation des MAP kinases dans les cellules HEK-293-FPRL1	86
Figure 38 : Caractérisation des lignées MEF-FPRL1 et MEF- β arr1&2 ^{-/-} -FPRL1	87
Figure 39 : Cinétique d'activation des MAP kinases dans les cellules MEF-FPRL1 déficientes ou non en β -arrestine	88
Figure 40 : Effet de la toxine pertussique sur l'activation des MAP kinases ERK1/2 dans les cellules HEK-293-FPRL1	89
Figure 41 : Effet de la toxine pertussique sur l'activation des MAP kinases ERK1/2 dans les cellules MEF-FPRL1 déficientes ou non en β -arrestine	90
Figure 42 : Alignement des domaines C-terminaux des récepteurs FPR et FPRL1	93
Figure 43 : Cartographie des acides aminés phosphorylés du récepteur FPRL1	93
Figure 44 : Schématisation du récepteur FPRL1 avec ses sites potentiels de phosphorylation regroupés en clusters	94
Figure 45 : Phosphorylation des mutants du récepteur FPRL1	96
Figure 46 : Schématisation des chimères entre les récepteurs FPRL1 et FPRL2	98
Figure 47 : Séquences des queues cytoplasmiques de FPRL1 et FPRL2	99
Figure 48 : Phosphorylation basale des récepteurs FPRL1 et 2 et de leurs chimères	100
Figure 49 : Co-localisation de la β -arrestine 2-EGFP et du récepteur FPRL1	102
Figure 50 : Internalisation du récepteur FPRL1 révélée par immunofluorescence dans les cellules MEF déficientes ou non en β -arrestine	103
Figure 51 : Séquestration de ligand radioactif dans les cellules MEF déficientes ou non en β -arrestine	103
Figure 52 : Schématisation de l'étiquetage TAP en C-terminal	107
Figure 53 : Schéma de la méthode TAP de purification et d'analyse de complexes protéiques	108
Figure 54 : Séquence du TAP-TAG du vecteur pZome1C®	109
Figure 55 : Les étapes de la purification TAP vues par immunodétection de la β -arrestine 1 étiquetée	110
Figure 56 : Expression stable des β -arrestines étiquetées dans le modèle cellulaire HEK-293	112
Figure 57 : Translocation des β -arrestines 2 étiquetée ou endogène à la membrane après stimulation	113
Figure 58 : Contenu protéique des différentes étapes de la purification TAP de la β -arrestine 1 étiquetée TAP dans le clone HEK-293- β Arr1-TAP	114
Figure 59 : Représentation graphique des résultats des analyses protéomiques menées sur les complexes formés autour des β -arrestines	117
Figure 60 : Co-immunoprécipitation de l'adaptine β_2 par la β -arrestine 2-TAP	120
Figure 61 : Schématisation de la structure des complexes AP, exemple de AP1	121
Figure 62 : Caractérisation de l'interaction entre les β -arrestines et la sous-unité β_{3A} du complexe AP3	122
Figure 63 : Effet des mutations R ^{394,396} G de la β -arrestine 2 sur son interaction avec AP3 ..	124

Figure 64 : Mobilisation du calcium intracellulaire dans les cellules HL-60 exprimant le récepteur FPRL1 étiqueté TAP	128
Figure 65 : Images d'immunofluorescence relatives à l'internalisation du récepteur FPRL1-TAP dans les cellules HEK-293	130
Figure 66 : Purification par affinité en tandem du récepteur FPRL1-TAP exprimé dans les cellules HEK-293 marquées métaboliquement au ³² P	132
Figure 67 : Schématisation d'une variante de la méthode TAP : le "split-TAG"	134

TABLE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Lignées stables disponibles ou établies durant la thèse.....	45
Tableau 2 : Liste des anticorps utilisés.....	49
Tableau 3 : Etapes successives de la coloration à l'argent des protéines contenues dans un gel SDS-PAGE	51
Tableau 4 : Vecteurs des différents vecteurs utilisés	57
Tableau 5 : Liste des oligonucléotides utilisés.....	58
Tableau 6 : Liste des peptides synthétiques testés	66
Tableau 7 : Activités biologiques des peptides (EC ₅₀ du test de mobilisation du calcium) dans les cellules exprimant les récepteurs de la famille FPR.....	69
Tableau 8 : Séquences C-terminales des mutants de phosphorylation de FPRL1	95
Tableau 9 : Compilation des résultats des analyses protéomiques menées sur les β-arrestines 1&2 étiquetées TAP	116

ABBREVIATIONS

17-AAG	17-(Allylamino)-17-demethoxyGeldanamycin
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
ADP	Adenosine DiPhosphate
AP	Adaptor Protein (protéine adaptatrice)
ARF6	ADP-Ribosylation Factor 6
ARN	Acide RiboNucléique
ARNO	ARF Nucleotide binding site Opener
ASK1	Apoptosis Signaling Kinase 1
AT _{1A} R	Récepteur de l'Angiotensine II Type 1A
ATCC	American Type Culture Collection
β ₂ AR	Récepteur β₂-Adrénergique
Aβ ₄₂	fragment de 42 acides aminés de la protéine β-amyloïde A
BSA	Bovine Serum Albumine
BOC	ButOxyCarbonyl
Bt ₂ -AMPc	diButyryl-Adénosine MonoPhosphate cyclique
C5aR	Récepteur de l'anaphylatoxine C5a
CBP	Calmodulin Binding Peptide (peptide de liaison à la calmoduline)
CCV	Clathrin Coated Vesicles (vésicules mantelées de clathrine)
CGD	Chronic Granulomatous Disease (Granulomatose septique chronique)
COX	Cytochrome c OXydase
cpm	coups par minute
CsH	Cyclosporine H
DABCO	1,4-DiAzaBiCyclo[2.2.2]Octane
DAG	diacylglycérol
DiI	1,1'-Diioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylIndolcarbocyanine perchlorate
DMSO	DiMethylSulfOxide
dNTP	désoxy-Nucleotide TriPhosphate
DUOX	OXydase DUale
DTT	DiThioThreitol
ECL	Enhanced ChemiLuminescence
EDTA	Ethylene Diamine Tetraacetic Acid
EEA1	Early Endosome Antigen 1
EGFP	Enhanced Green Fluorescent Protein
EGTA	Ethylene Glycol Tetraacetic Acid
Elk-1	Ets domain-containing Transcription Factor 1
ERK	Extracellular signal-Regulated Kinase
FAD	Flavine Adénine Dinucléotide

FITC	F luorescein I so T hio C yanate
FPR	N - F ormyl P eptide R eceptor
FPRL1/2	F ormyl P eptide R eceptor- L ike ½
FSH	F ollicle- S timulating H ormone
Fura2-AM	ester A ceto M ethoxyl de Fura2
GEF	G uanine-nucleotide E xchange F actor
G-CSF	G ranulocyte C olony S timulating F actor
GM-CSF	G ranulocyte- M onocyte C olony S timulating F actor
GRK	G PCR K inase
GST	G lutathion S - T ransférase
GTP, GDP ou GMP	G uanosine T ri P hosphate, D i P hosphate ou M ono P hosphate
HEK	H uman E mbryonic K idney fibroblast-like
HIV	H uman I mmunodeficiency V irus
HRP	H orse R adish P eroxidase
Hsp	H eat s hock p rotein
IB, IF, IP	I mmuno B lot, I mmuno F luorescence, I mmuno P réciptation
Ig	I mmunoglobuline
IGF-1	I nsulin-like G rowth F actor 1
IP ₃	I nositol tri P hosphate
JNK	c - J un N -terminal K inase
kDa	k ilo D alton
KRAB	K Rueppel- A ssociated B ox
LAD	L eucocyte A dhesion D eficiency (déficit d'adhésion des leucocytes)
LB	L uria- B roth
LPS	L ipo P oly S accharide
LXA ₄	L ipo X ine A ₄
MAPK	M itogen- A ctivated P rotein K inase
MEF	M ouse E mbryonic F ibroblast
NFκB	N ecrosis F actor κ B
MKK	M AP K inase K inase
MKP7	M AP K inase P hosphatase 7
NDx	sous-unité x de la NADH déshydrogénase
NADPH	forme réduite du N icotinamide A dénine D inucléotide P hosphate
NES	N uclear E xport S ignal (signal d'export nucléaire)
NOX	N ADPH O Xyde
PAF	P latelet A ctivating F actor
PAR	P rotease- A ctivated R eceptor
PBS	P hosphate B uffered S aline (tampon phosphate salin)
PCR	P olymerase C hain R eaction (réaction en chaîne par polymérase)

pEF	p romoteur du F acteur d' E longation humain
PFA	P ara F orm A ldéhyde
PI3K	P hospho I nositide 3 K inase
PIP ₂	P hospho I nositol-4,5-bis P hosphate
PIP ₃	P hospho I nositol-3,4,5-tri P hosphate
PKA, PKC	P rotéine K inase A ou C
PLA, C ou D	P hospho L ipase A , C ou D
PP1	P yrazol P yrimidine 1
PP2A	P rotein P hosphatase 2A
PTX	T o X ine P ertussique
ProtA	répétition de deux domaines de la P rotéine A liant les IgG
RCPG	R écepteurs C ouplés aux P rotéines G
RGS	R egulator of G protein S ignaling (régulateur de la signalisation par les protéines G)
Rho-GDI	R ho- G DP D issociation I nhibitor
ROS	R eactiv O xygen S pecies (espèces réactives de l'oxygène)
SDS	D odécyl S ulfate de S odium
SDS-PAGE	E lectrophorèse sur G el de P oly A crylamide en présence de SDS
SH3	S rc H omology domain 3
siRNA	s mall i nterfering R NA (petits ARN interférents)
snRNP	s mall n uclear R ibo N ucleo P rotein
SRAS	S yndrome R espiratoire A igü S évère
TAP	T andem A ffinity P urification (purification par affinité en tandem)
TCA	A cide T ri C hloroacétique
TetO	O opérateur T etracycline bactérien
TetR	R épresseur T etracycline bactérien
TEV	T obacco E tch V irus
TGF-β	T ransforming G rowth F actor
TNF-α	T umor N ecrosis F actor α
Tris	T ris[hydroxyméthyl]aminométhane
WASP	W iskott- A ldrich S yndrome P rotein

INTRODUCTION

A/ Les phagocytes, première ligne de défense de l'organisme contre les pathogènes

I- Les phagocytes

Les phagocytes (neutrophiles, monocytes et macrophages) constituent la première ligne de défense de l'organisme contre les micro-organismes pathogènes. Ces cellules appartiennent à la famille des leucocytes (ou globules blancs) qui comprend les granulocytes (polynucléaires neutrophiles, éosinophiles et basophiles), les lymphocytes et les monocytes.

Les **polynucléaires neutrophiles** représentent plus de la moitié des leucocytes (~65%), les lymphocytes comptant pour le quart, alors que les autres cellules sont très minoritaires. Comme les autres granulocytes, ces cellules présentent un noyau multilobé (et non pas plusieurs noyaux comme le laisserait supposer leur nom) et de nombreux granules dans leur cytoplasme (Figure 1). Ce sont les cellules leucocytaires possédant la plus grande capacité de défense contre les microorganismes pathogènes. Les fonctions cellulaires du neutrophile seront détaillées dans le chapitre II.

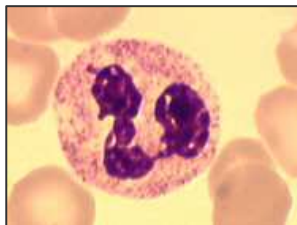


Figure 1 : Polynucléaire neutrophile entouré de globules rouges après coloration au May-Grünwald-Giesma

Image du Laboratoire d'Hématologie du C.H.U. d'Angers

Le **monocyte** est la plus grande cellule du sang. Il se caractérise par son noyau encoché et par son cytoplasme étendu parsemé de fines granulations. Il séjourne quelques jours dans le sang avant de gagner les tissus, dans lesquels il se transforme en macrophage (cellule ayant la capacité d'ingérer des particules solides). Sa fonction est proche de celle des polynucléaires neutrophiles. Le monocyte intervient dans l'élimination des bactéries, des particules étrangères ou des globules rouges âgés grâce à une activité de phagocytose moins spécifiquement antibactérienne que celle des neutrophiles. Il intervient également dans certaines étapes des réactions immunologiques, en particulier en assurant la transformation des protéines étrangères en peptides antigéniques.

Les **macrophages**, comme les polynucléaires neutrophiles, participent à la réaction inflammatoire, au nettoyage et à la remise en état des tissus altérés par l'agression de germes

étrangers. La capture des germes est facilitée par des molécules appelées opsonines (anticorps et complément). En exposant à leur surface, après les avoir digérées, les protéines étrangères, les macrophages jouent un rôle essentiel dans le développement de la réponse immunitaire en présentant les antigènes aux lymphocytes T.

Tous ces types leucocytaires, ainsi que les érythrocytes (globules rouges) et les plaquettes, dérivent de cellules souches hématopoïétiques pluripotentes dont la différenciation et la maturation ont lieu principalement dans la moëlle osseuse et sont contrôlées par des facteurs de croissance spécifiques. L'ensemble des processus conduisant aux cellules sanguines matures constitue l'**hématopoïèse** (Figure 2).

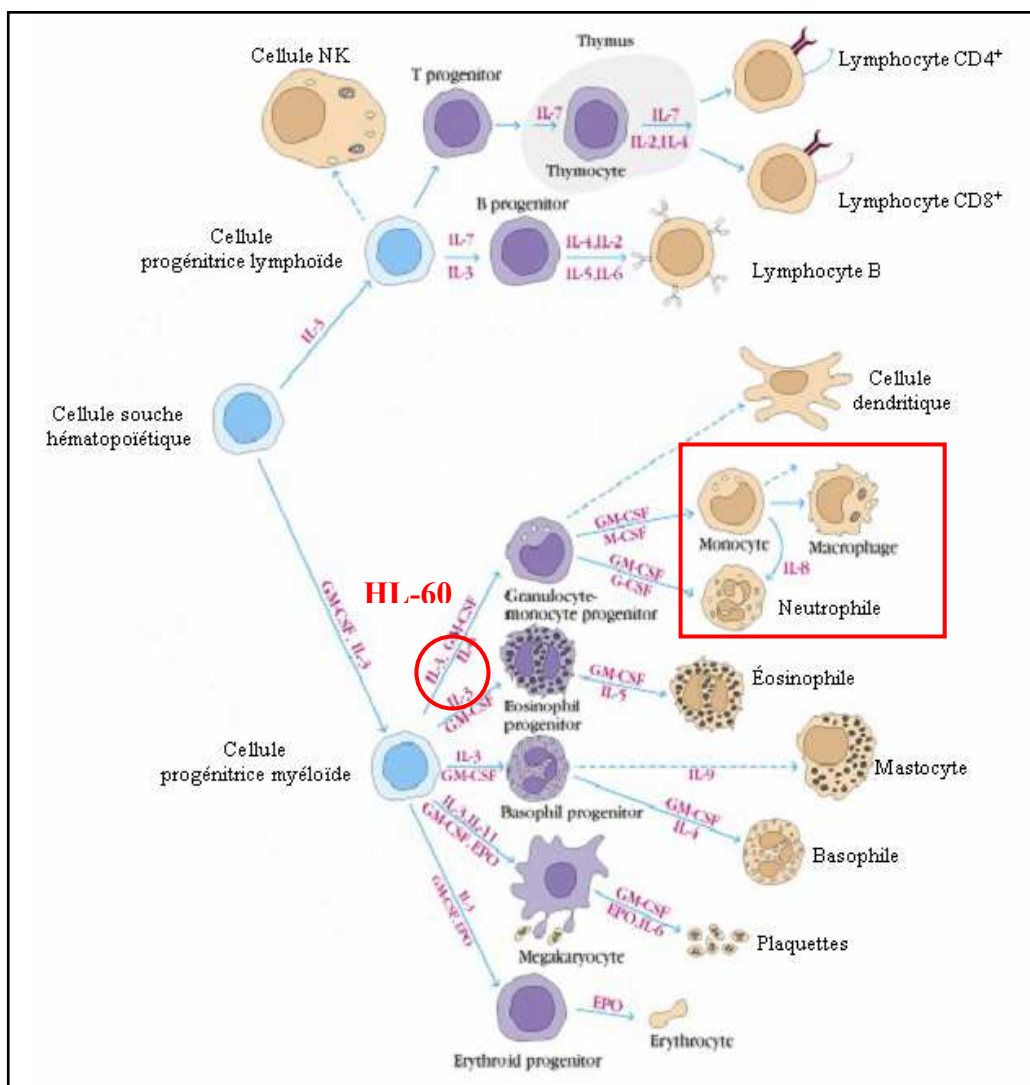


Figure 2 : Schématisation de l'hématopoïèse

Les neutrophiles, monocytes et macrophages dérivent de cellules progénitrices myéloïdes. Les cellules de la lignée HL-60 sont à un stade de différenciation situé en amont des progéniteurs de type granulocyte-monocyte. Les cellules HL-60 peuvent être différenciées vers un phénotype neutrophile ou monocyte-macrophage (*d'après Goldsby et al., 2000*).

La différenciation des cellules souches hématopoïétiques vers les cellules progénitrices myéloïdes et finalement vers le neutrophile mature est sous le contrôle successif de facteurs protéiques, notamment l'interleukine 3, et les facteurs de croissance GM-CSF (Granulocyte-Monocyte Colony Stimulating Factor) et G-CSF (Granulocyte Colony Stimulating Factor).

II- Les fonctions cellulaires du neutrophile

Les principales fonctions des polynucléaires neutrophiles se déclinent ainsi : le chimiotactisme permettant à la cellule de se rendre rapidement sur le site infectieux, la phagocytose visant à l'internalisation des bactéries, la dégranulation d'enzymes lytiques et l'explosion respiratoire génératrice de dérivés microbicides de l'oxygène.

II-1 Le chimiotactisme ou migration cellulaire dirigée

Lors d'un processus infectieux, ou après un dommage tissulaire ou une inflammation, des cytokines sont produites et vont modifier localement les propriétés adhésives et la perméabilité de l'endothélium. Les leucocytes qui circulent dans le sang adhèrent à l'endothélium par des mécanismes de margination, c'est-à-dire qu'ils s'accolent et roulent le long de la paroi du vaisseau sanguin. Sous l'effet des facteurs chimiotactiques établis en gradient de concentration décroissante à partir du foyer infectieux, les neutrophiles s'insinuent entre les cellules endothéliales et traversent la paroi vasculaire (diapédèse ou extravasation), puis migrent dans les tissus.

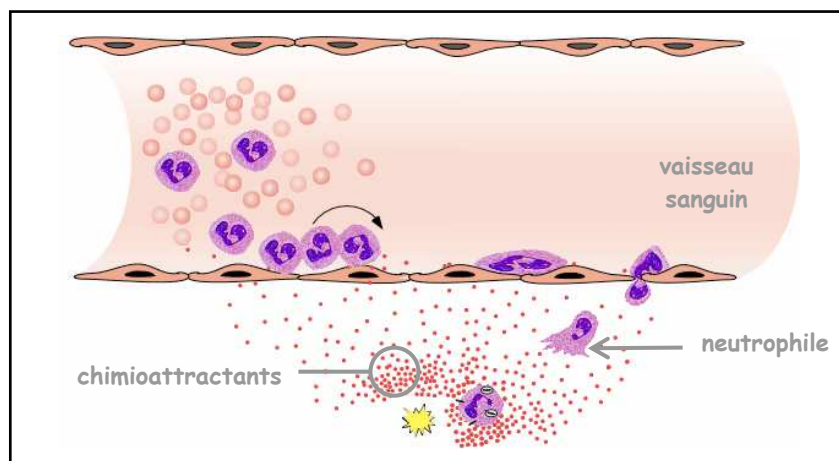


Figure 3 : Migration du neutrophile vers le site inflammatoire

La contribution des protéines d'adhérence (sélectines, intégrines et membres de la superfamille des immunoglobulines), ainsi qu'un perpétuel remodelage du cytosquelette d'actine avec la participation de la myosine et des protéines d'ancrage de l'actine à la membrane plasmique (ezrine, radixine, moésine), sont les éléments majeurs générant les forces motrices de la chemotaxie. Ainsi, l'avant de la cellule émet de fins lamellipodes alors qu'un uropode contractile se forme à l'arrière de la cellule (Figure 4). Ces modifications ont lieu sous le contrôle de kinases, notamment la PI3 kinase (PhosphoInositide 3 kinase), et de petites GTPases monomériques telles que Rho, Rac et Cdc42 (Ridley et al., 2003). Il est remarquable de noter que, bien que la variation de concentration dans le gradient entre l'avant et l'arrière de la cellule soit infime, le neutrophile est tout de même capable de percevoir cette variation grâce à une compartimentation des signaux générés finement régulée dans le temps et dans l'espace.

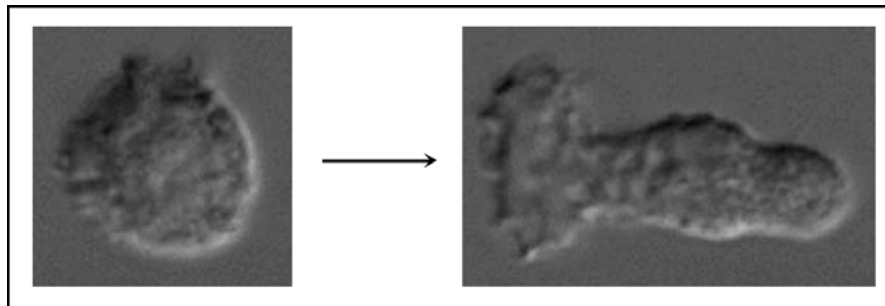


Figure 4 : Polarisation d'un neutrophile

En présence de chimioattractant, le neutrophile change de morphologie et passe d'une cellule assez ronde et lisse à une cellule allongée et plissée et présentant des pseudopodes pointant vers les concentrations les plus fortes de chimioattractants, la cellule est alors dite "**polarisée**" (d'après Weiner et al., 1999).

La migration dirigée des neutrophiles vers le site infectieux est donc un processus intégré de plusieurs étapes hautement complexes. Elle est initiée par des molécules appelées **chimioattractants**. Ces molécules sont libérées par les microorganismes invasifs ou générées de manière endogène par l'hôte. Elles diffusent en formant un gradient continu de concentration décroissante à partir du site inflammatoire. Le mouvement dirigé des neutrophiles vers le site infectieux est initié par la fixation de ces molécules chimiotactiques sur des récepteurs membranaires spécifiques, appelés **récepteurs de chimioattractants**. L'activation de ces récepteurs déclenche des cascades de signalisation intracellulaires dont les étapes seront plus détaillées dans un autre chapitre de cette thèse (cf. § B/II-4).

II-2 La phagocytose (pour revue : Verhoef et R. Visser, 1993)

La plupart des microorganismes ne peuvent être reconnus et phagocytés par les polynucléaires neutrophiles qu'après avoir été opsonisés, c'est-à-dire recouverts de facteurs du complément et d'anticorps pouvant être reconnus par les récepteurs des neutrophiles. La paroi bactérienne peut être chargée en facteur activé C3b du complément qui est reconnu par les récepteurs CR1 et CR3 du neutrophile. Ce type d'**opsonisation** suffit à l'attachement mais pas à l'ingestion des microorganismes qui requiert des interactions plus fortes de type antigène-anticorps. Ainsi, des immunoglobulines (Ig) G1 et G3 se fixent à des antigènes spécifiques à la surface des bactéries et servent de ligands aux neutrophiles qui présentent des récepteurs aux fragments Fc de ces IgGs. D'autres opsonines plus spécifiques du type de microorganismes sont capables d'initier l'interaction hôte-pathogène, c'est le cas de la "lipopolysaccharide (LPS) binding protein" qui se lie au LPS des bactéries Gram-négatif et au récepteur CD14 des cellules phagocytaires.

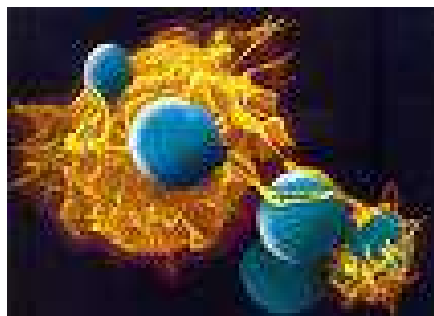


Figure 5 : Phagocytose de *candida albicans* par un polynucléaire neutrophile

Comme l'illustre la Figure 5, après opsonisation, les pathogènes sont littéralement ingérés par les neutrophiles grâce à l'émission de pseudopodes qui entourent les microorganismes opsonisés et vont permettre leur engloutissement par fusion membranaire dans une vacuole appelée le **phagosome**. C'est dans ce compartiment isolé du reste de la cellule que le pathogène va être tué et digéré.

II-3 La mobilisation des granules

Les neutrophiles matures ne synthétisent que peu de protéines de novo. Ils possèdent au contraire des stocks de protéines qu'ils peuvent mobiliser très rapidement suivant les besoins. Ces protéines sont compartimentées dans des organelles de stockage intracellulaires appelées

granules. Par ailleurs, les granules peuvent fusionner avec le phagosome contenant un pathogène. Ce processus, appelé **dégranulation**, permet le déversement dans les vacuoles de phagocytose de nombreuses enzymes lysosomales, donnant ainsi naissance au **phago-lysosome**. Les enzymes lysosomales interviennent dans la digestion des pathogènes phagocytés. D'autre part, la fusion des granules peut avoir lieu avec la membrane plasmique, ce qui permet de compenser la surface membranaire perdue lors de la phagocytose mais aussi d'augmenter rapidement la quantité de protéines membranaires, notamment les récepteurs de surface ("up-regulation"). Le contenu des granules peut aussi être déversé dans le milieu extérieur.

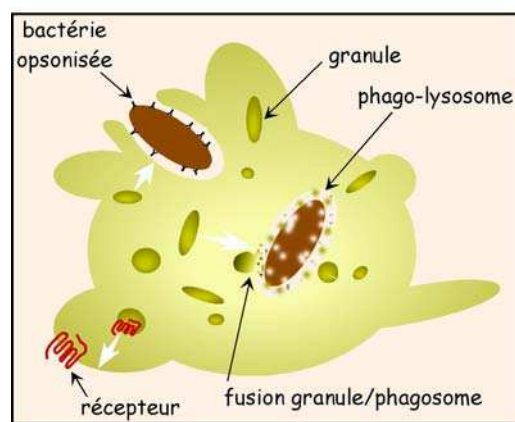


Figure 6 : Schématisation de la dégranulation du neutrophile

Les polynucléaires contiennent plusieurs types de granules (pour revue : Segal, 2005). Dans les **granules primaires** (ou granules denses azurophiles) sont contenus des peptides et des protéines visant principalement à la destruction des bactéries, comme la myéloperoxydase, le lysozyme (hydrolyse des parois bactériennes), la cathepsine G et l'élastase. Dans les **granules secondaires** (ou granules spécifiques), on note, entre autres, la présence de lysozyme, lactoferrine, gélatinase et de protéines membranaires comme le flavocytochrome b_{558} de la NADPH oxydase. Les **granules tertiaires** (ou granules gélatinase) contiennent de la gélatinase mais pas de lactoferrine. Les **vésicules sécrétrices** sont les vésicules les plus rapidement mobilisables et contiennent, entre autres, la phosphatase alcaline et le flavocytochrome b_{558} de la NADPH oxydase. Elle présentent également dans leur membrane une réserve de récepteurs, notamment de récepteurs de chimioattractants, qui peut être mobilisée rapidement (Sengelov et al., 1994). Ces granules fusionnent avec la membrane plasmique des neutrophiles activés pour augmenter le nombre de récepteurs en surface et amplifier la réponse aux chimioattractants.

II-4 L'explosion respiratoire, la NADPH oxydase (pour revues : Babior, 2004; Vignais, 2002)

La principale fonction microbicide des neutrophiles consiste en la libération d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) dans l'environnement du site infectieux et dans les vésicules phago-lysosomales. Leur production est assurée par la **NADPH oxydase phagocytaire** qui est une enzyme présente dans les cellules phagocytaires et également dans d'autres types cellulaires, comme les lymphocytes B (Morel et al., 1993), les cellules endothéliales (Gorlach et al., 2000) et les ostéoclastes (Yang et al., 2001). Elle catalyse la production d'ions superoxyde (O_2^-) à partir de l'oxygène et du NADPH (forme réduite du Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate) selon la réaction :



La NADPH oxydase est un complexe protéique composé de protéines membranaires et cytosoliques qui s'assemblent lors de l'activation (Figure 7). Il comprend :

- deux sous-unités membranaires, formant le cytochrome b_{558} : gp91^{phox} et p22^{phox},
- trois facteurs cytosoliques : p67^{phox}, p47^{phox} et p40^{phox},
- et une petite protéine G monomérique (Rac).

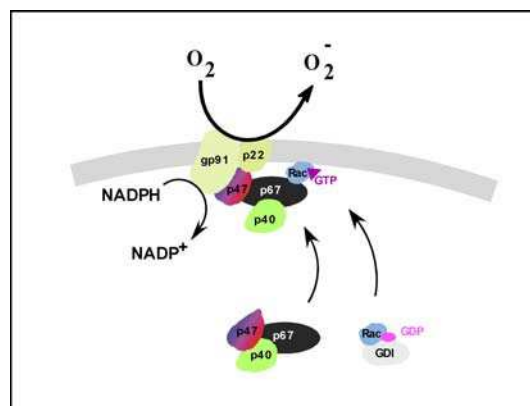


Figure 7 : Schématisation de l'assemblage du complexe NADPH oxydase phagocytaire

L'activité oxydase ne s'exprime que si tous les éléments sont assemblés de manière coordonnée au niveau de la membrane. L'assemblage de la forme active de la NADPH oxydase implique des processus de phosphorylation qui sont essentiels à l'activation et de multiples interactions entre les composants de la NADPH oxydase. Les interactions moléculaires entre ces composants relèvent principalement d'interactions de type SH3 (Src Homology domain 3) et des domaines polyproline.

Les sous-unités gp91^{phox} et p22^{phox} forment le flavocytochrome b₅₅₈. La sous-unité gp91^{phox} comporte tous les groupes prosthétiques nécessaires au transfert d'électrons du NADPH vers l'oxygène (le FAD, Flavine Adénine Dinucléotide, deux hèmes, et un site de liaison pour le NADPH).

Dans les neutrophiles au repos, les protéines p67^{phox}, p47^{phox} et p40^{phox} sont présentes sous forme d'un complexe cytosolique de 250 kDa. Lors de l'activation de la NADPH oxydase, ces protéines, qualifiées de sous-unités régulatrices, migrent à la membrane plasmique pour se fixer au flavocytochrome b₅₅₈ et l'activer.

L'activation met également en jeu la protéine Rac. Au repos, Rac liée au GDP (Guanosine DiPhosphate) est majoritairement présente dans le cytosol, sous forme complexée à la protéine inhibitrice Rho-GDI (Rho-GDP Dissociation Inhibitor). Dans le complexe oxydase actif, Rac, dissociée de Rho-GDI, est liée au GTP (Guanosine TriPhosphate). La migration de Rac à la membrane s'effectue de manière indépendante par rapport aux autres facteurs cytosoliques cités précédemment.

Le rôle physiologique de la NADPH oxydase phagocytaire est primordial dans la réponse de l'hôte aux infections. Un dysfonctionnement de cette enzyme, causé par des mutations affectant les composants de ce complexe protéique, est à l'origine de la **granulomatose septique chronique** (CGD), qui est une maladie héréditaire caractérisée par des infections graves et récidivantes.

Il est à noter que d'autres oxydases ont récemment été mises en évidence dans d'autres types cellulaires que les phagocytes, il s'agit d'homologues de gp91^{phox} appelés **NOXs** pour NADPH oxydases ou **DUOXs** pour oxydases duales. Dans cette nouvelle nomenclature, gp91^{phox} a été dénommée NOX2. Les NOXs autres que gp91^{phox} sont exprimées principalement dans l'épithélium, les cellules musculaires lisses et l'endothélium, elles génèrent de petites quantités de ROS, apparemment à des fins de transduction du signal dans les mécanismes de croissance, d'angiogenèse et d'apoptose (Lambeth, 2004). Il a été montré plus récemment que les NOXs peuvent être ciblées dans des compartiments cellulaires discrets pour la production localisée de ROS ; ce serait le cas, par exemple, au sein des complexes focaux des lamellipodes, où les ROS seraient requis pour la migration cellulaire dirigée (Ushio-Fukai, 2006).

B/ Les récepteurs de chimioattractants

Tout système biologique se doit de pouvoir "ressentir" son environnement et de réagir en conséquence.

La notion de "**récepteur membranaire spécifique**" a été introduite par les travaux de l'immunologiste **Paul Ehrlich** dans le cadre de l'étude des toxines, travaux pour lesquels il a reçu le prix Nobel de physiologie ou médecine en 1908.

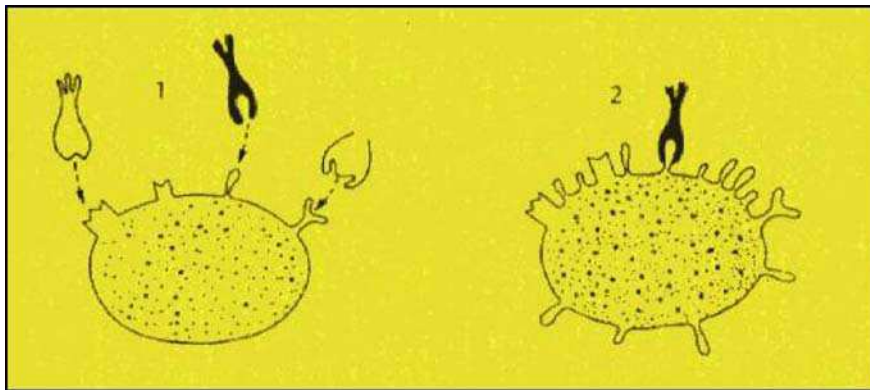


Figure 8 : Schématisation de la notion de récepteur membranaire spécifique
dessin suggestif, réalisé par Paul Ehrlich lui-même (Ehrlich, 1900).

Le récepteur est enchâssé dans la membrane plasmique et sa spécificité est apportée par sa structure qui présente une poche de liaison parfaitement adaptée à la reconnaissance de la molécule signal, cette molécule est appelée **agoniste**. La fixation de l'agoniste sur son récepteur membranaire à l'extérieur de la cellule entraîne un changement conformationnel du récepteur qui conduit à la mise en place d'interactions protéiques à l'intérieur de la cellule qui aboutissent finalement à une cascade de signaux intracellulaires menant à terme à l'exécution de fonctions cellulaires adaptées.

Les récepteurs membranaires peuvent être classés selon deux types majeurs de transduction du signal : les récepteurs transduisant eux-mêmes le signal (récepteurs canaux, récepteurs enzymes) et les récepteurs couplés à une protéine effectrice intermédiaire, dont font partie les récepteurs de chimioattractants qui sont couplés à une GTPase hétérotrimérique.

I- Les récepteurs couplés aux protéines G hétérotrimériques (pour revue : Bockaert et al., 2002)

La superfamille des récepteurs couplés aux protéines G (RCPGs) est la famille de récepteurs la plus importante, elle compte chez les mammifères pour près de 1000 gènes. Hormis le fait qu'ils soient tous couplés à une protéine G hétérotrimérique, la caractéristique majeure de ces récepteurs est leur structure secondaire faite de 7 hélices transmembranaires, c'est pourquoi on les nomme également **récepteurs à 7 hélices** ou à 7 domaines transmembranaires ou encore de façon plus imagée **récepteurs serpentins**. La partie N-terminale extracellulaire du récepteur diverge énormément entre les membres de la famille des RCPGs, c'est elle qui assure la reconnaissance des ligands spécifiques. La rhodopsine est le seul RCPG dont la structure cristallographique ait été résolue (Okada et al., 2000). La partie C-terminale cytoplasmique de ce récepteur est composée d'une huitième hélice, plateforme participant à la reconnaissance de la protéine G. Les RCPGs sont retrouvés dans la plupart des types cellulaires, et sont impliqués dans un spectre extrêmement large de fonctions biologiques. De nombreuses pathologies, comme les rétinites pigmentaires ou l'hyperactivité thyroïdienne, sont liées à un mauvais fonctionnement ou à une mauvaise régulation des RCPGs (pour revue : Spiegel, 1996).

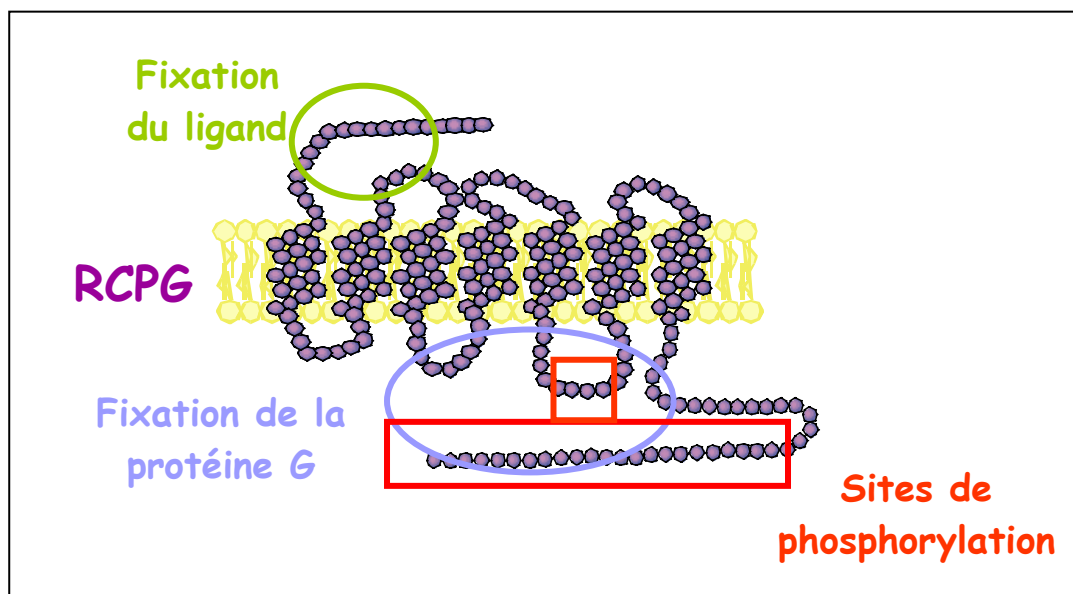


Figure 9 : Représentation schématique d'un RCPG dans la membrane plasmique

Les zones de fixation du ligand sont figurées en vert, celles de fixation de la protéine G en bleu et les zones qui participent à la régulation du récepteur par phosphorylation en rouge.

Une fois stimulés, les récepteurs à 7 hélices subissent un **changement de conformation** qui induit l'activation de la protéine G hétérotrimérique à laquelle ils sont couplés. Ces protéines G ont été découvertes dans les années 1970. **Martin Robdell** et **Alfred Gilman** ont tous deux reçu le prix Nobel de physiologie ou médecine en 1994 pour leurs travaux séparés sur ces protéines G et leur rôle dans la transmission des signaux dans les cellules. Les protéines G hétérotrimériques sont composées de trois sous-unités : α qui fixe les nucléotides de type guanine et porte l'activité GTPase, et β et γ qui restent associées sous forme d'un dimère. Leur cycle d'activation commence par la dissociation de la sous-unité α du dimère $\beta\gamma$ (Figure 10). La sous-unité α est alors le siège de l'échange du GDP pour du GTP et c'est sous sa forme associée au GTP qu'elle est active et peut agir sur des effecteurs de la signalisation (cf. § B/II-4). Les fonctions du dimère $\beta\gamma$ sont moins bien connues mais engagent également des effecteurs de la signalisation. La désactivation implique une hydrolyse du GTP en GDP, catalysée par des protéines RGS (Regulator of G protein Signaling). En fin de cycle, la sous-unité α se retrouve sous forme inactive liée au GDP et se réassocie avec le dimère $\beta\gamma$ pour reformer la protéine G hétérotrimérique inactive. Il existe de nombreuses isoformes des sous-unités β , γ et surtout α des protéines G. Les différents types de sous-unités $G\alpha$ sont classés par familles : α_i , α_s , α_q et α_{12} .

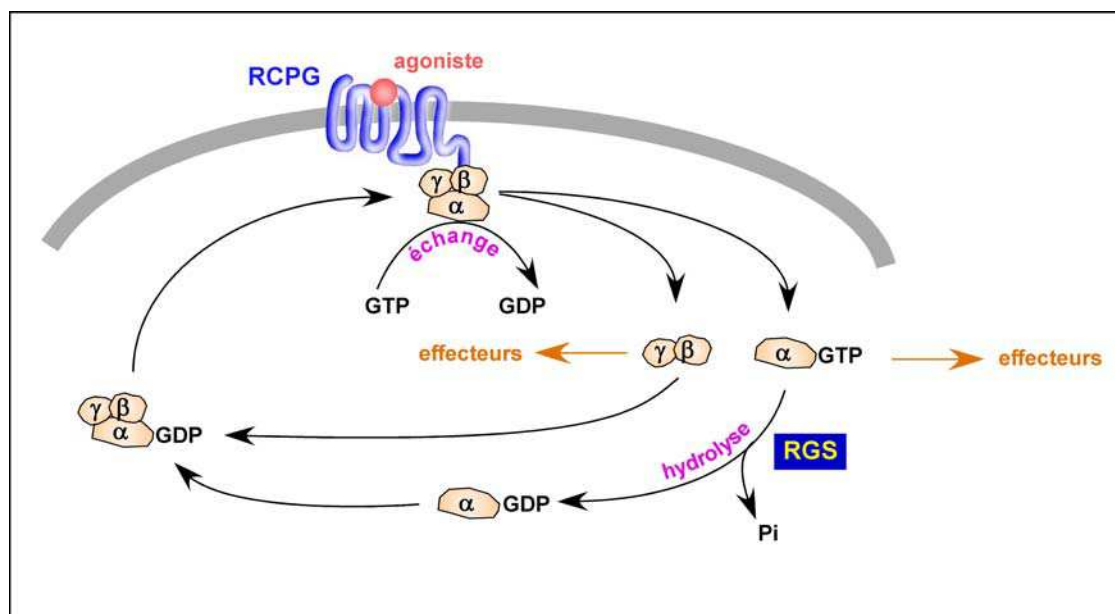


Figure 10 : Cycle d'activation des protéines G hétérotrimériques

II- Les récepteurs chimiotactiques

Les molécules chimioattractantes ont été définies comme telles car elles induisent le chimiotactisme des phagocytes qui reconnaissent ces molécules grâce à des récepteurs de surface de type RCPG appelés récepteurs chimiotactiques (pour revue : Ye et Boulay, 1997). Parmi ces récepteurs sont retrouvés :

- les **récepteurs de chimioattractants** dits **classiques**, comme le récepteur de l'anaphylatoxine C5a (C5aR), les récepteurs de la famille FPR (N-Formyl Peptide Receptor), les récepteurs du leukotriène B4 et du PAF (Platelet Activating Factor)
- et les récepteurs de chimiokines.

Ils présentent des caractéristiques communes les différenciant des autres sous-groupes de RCPGs (pour revue : Murphy, 1994) :

- leurs séquences sont similaires en taille avec environ 350 acides aminés. Ce sont les plus petits membres de la famille des RCPGs. Cette petite taille est due à une séquence N-terminale de longueur moyenne, à une 3^{ème} boucle intracellulaire i3 très courte et à un domaine C-terminal relativement court.
- leurs différents membres présentent plus de 20 % d'identité entre eux.
- la très courte boucle i3 (de 16 à 22 acides aminés) est enrichie en acides aminés basiques. Dans la plupart des cas, cette boucle i3 peut être modélisée sous la forme d'une hélice α qui présente un côté hydrophobe et l'autre chargé positivement.
- le segment N-terminal extracellulaire est le plus souvent acide.
- les gènes codant ces récepteurs sont en général sans intron.

II-1 Description générale des récepteurs de la famille FPR

Le récepteur humain FPR (N-Formyl Peptide Receptor) est le premier récepteur de chimioattractants présent à la surface des neutrophiles à avoir été caractérisé biochimiquement (Showell et al., 1976). Il doit son nom au fait qu'il se lie avec une haute affinité à des peptides N-formylés, et notamment le f-MLF (N-formyl-methionyl-leucyl-phénylalanine). Sa structure primaire a été élucidée au début des années 90 grâce au clonage de deux formes alléliques à partir d'une banque d'ADNc issue de cellules HL-60 différenciées (Boulay et al., 1990a; Boulay et al., 1990b). Depuis, la famille des récepteurs de chimioattractants des cellules

myéloïdes s'est agrandie (pour revue : Ye et Boulay, 1997). Deux récepteurs homologues à FPR, FPRL1 et 2 (FPR-Like 1 et 2), ont été clonés (Bao et al., 1992; Murphy et al., 1992). Les trois gènes correspondant à la famille des récepteurs FPR forment un cluster sur le chromosome 19. Malgré un fort degré d'identité avec FPR (69%), FPRL1 ne se lie au f-MLF qu'avec une faible affinité. FPRL1 est également appelé récepteur de la lipoxine A₄ (LXA₄), car ce médiateur lipidique a été le premier ligand endogène de haute affinité découvert pour FPRL1 (Fiore et al., 1994). Le troisième membre de la famille FPR, FPRL2, partage 56% d'identité avec FPR, mais il ne se lie pas, ni ne répond au peptide f-MLF. Les deux homologues de FPR montrent une forte identité avec celui-ci au niveau des parties cytoplasmiques, alors que les boucles extracellulaires sont plus divergentes.

Une étude de l'occurrence de polymorphismes pour les gènes codant FPR et FPRL1 a révélé qu'il n'existe pas de polymorphisme pour *FPRL1*, alors que plusieurs isoformes de FPR ont pu être mises en évidence (Sahagun-Ruiz et al., 2001). Certaines de ces isoformes sont associées à des phénotypes plus ou moins marqués. Les formes R190W et N192K sont par exemple associées à la periodontite agressive (inflammation des gencives) (Zhang et al., 2003). Les isoformes FPR98 et FPR-G6 pourraient, quant à elles, résulter en un défaut de couplage du récepteur à la protéine G (Wenzel-Seifert et Seifert, 2003).

II-2 Ligands des récepteurs de la famille FPR (pour revues : Migeotte et al., 2006 et Rabiet *et al.*, 2007, *Biochimie*, sous presse)

Les zones de fixation des ligands sur les récepteurs de chimioattractants impliquent le domaine N-terminal et les boucles extracellulaires e1 et e2, toutes deux reliées par un pont disulfure. De nombreux agonistes et antagonistes des récepteurs de la famille FPR sont désormais connus. FPR et FPRL1 sont qualifiés de récepteurs infidèles qui peuvent être activés par un spectre assez large d'agonistes peptidiques ne présentant pas de caractéristiques structurales communes. Ces agonistes peuvent être synthétiques, dérivés de l'hôte ou des pathogènes. FPRL2 est activé avec une faible capacité par quelques peptides chimiotactiques non-formylés qui sont également des agonistes de FPRL1 (Betten et al., 2001; Christophe et al., 2001).

II-2-1 Agonistes

Des criblages aléatoires de banques de peptides ont permis de découvrir des agonistes des récepteurs de la famille FPR. Le peptide WKYMVM et le peptide WKYMVm, où la méthionine finale présente une conformation dextrogyre, diffèrent dans leur capacité à activer les récepteurs de la famille FPR (Baek et al., 1996; Seo et al., 1997). Le peptide WKYMVm active les trois récepteurs FPR, FPRL1 et FPRL2, et présente une meilleure affinité pour FPRL1. Par contre, l'isomère WKYMVM n'a quasiment aucune capacité à activer FPR (Christophe et al., 2001; Dahlgren et al., 2000).

Les principaux agonistes naturels des récepteurs FPR dérivent des virus et bactéries. Des peptides dérivés de protéines de l'enveloppe du virus HIV1 ont été décrits comme agonistes des récepteurs FPR et FPRL1 (Su et al., 1999b). Le peptide Hp(2-20) de la bactérie *Helicobacter pylori* est capable d'activer la mobilisation du calcium et la NADPH oxydase chez le neutrophile par l'intermédiaire du récepteur FPRL1 (Bylund et al., 2001).

Il existe également des agonistes des récepteurs de la famille FPR qui proviennent de l'hôte même. Le premier à avoir été découvert a été la lipoxine A₄ qui est un agoniste de haute affinité pour FPRL1 (Fiore et al., 1994), mais cet agoniste est un mauvais activateur des fonctions du neutrophile. Des protéines de type amyloïde, ou des fragments dérivés de telles protéines, peuvent activer les cellules myéloïdes via FPRL1 (Le et al., 2001; Su et al., 1999a). L'humanine, un peptide neuroprotecteur de 24 acides aminés retrouvé dans la région occipitale du cerveau, utilise également le récepteur FPRL1 de manière fonctionnelle. De manière intéressante, la cathepsine G, qui est libérée lors de la dégranulation du neutrophile, présente des propriétés chimiotactiques par l'intermédiaire du FPR (Sun et al., 2004).

D'autres agonistes N-formylés des récepteurs de la famille FPR ont pu être identifiés durant ce travail de thèse, certains provenant de *Listeria monocytogenes* et d'autres, de façon plus originale, de protéines mitochondriales humaines (cf. section A des Résultats et Discussions et Rabiet et al., 2005).

II-2-2 Antagonistes

Ces antagonistes sont des ligands des récepteurs, au même titre que les agonistes, à ceci près qu'ils n'entraînent pas d'activation du récepteur, c'est-à-dire ni changement de conformation, ni signalisation intracellulaire, ils se comportent donc comme des inhibiteurs.

Des composés antagonistes ont été identifiés pour FPR et FPRL1. Pendant de nombreuses années, le peptide t-BOC, forme N-ButOxyCarboxylée du peptide FLFLF, a été considéré comme l'antagoniste le plus puissant de l'action du f-MLF (Freer et al., 1980). En 1993, le décapeptide cyclique cyclosporine H (CsH), dérivé du champignon *Tolypocladium inflatum*, a été décrit comme un inhibiteur fort de FPR, environ dix fois plus puissant et sélectif que les antagonistes connus jusqu'alors (Wenzel-Seifert et Seifert, 1993). La CsH agit comme un agoniste inverse, faisant passer le récepteur FPR d'un état actif (R*) à un état inactif (R) (Wenzel-Seifert et al., 1998).

Il a été montré que certains pathogènes étaient capables de sécréter des protéines ou peptides avec des propriétés antagonistes. Ainsi les virus HIV 1 et 2, Ebola, le coronavirus du SRAS (Syndrome Respiratoire Aigu Sévère) possèdent des protéines de surface dont dérivent des peptides antagonistes pour FPR (Mills, 2006). La bactérie *Staphylococcus aureus* est capable de sécréter des petites protéines à activité antagoniste pour FPR (de Haas et al., 2004; Prat et al., 2006). Ces microorganismes semblent en cela avoir développé des stratagèmes pour échapper à la première ligne de défense de l'hôte constitué par les phagocytes.

Récemment, deux antagonistes du récepteur FPRL1 ont été identifiés, il s'agit du peptide synthétique WRWWWW (Bae et al., 2004) et de PBP10, un peptide dérivé de la gelsoline (Cunningham et al., 2001). Ce sont les rares composés à inhiber spécifiquement l'activité de FPRL1.

II-3 Localisation cellulaire et tissulaire des récepteurs de la famille FPR

Parallèlement au nombre grandissant de ligands de la famille FPR, la distribution cellulaire et tissulaire de ces récepteurs s'est élargie. FPR et FPRL1 sont exprimés dans monocytes-macrophages et les neutrophiles alors que FPRL2 est présent dans les monocytes-macrophages mais pas dans les neutrophiles. L'expression des récepteurs des peptides N-formylés dans une variété de cellules autres que les cellules phagocytaires (Migeotte et al., 2006 et Rabet et al., 2007, *Biochimie*, sous presse) suggère que ces récepteurs puissent avoir des rôles fonctionnels autres que la défense de l'hôte dans la réponse immunitaire innée. Un rôle précis du récepteur FPRL1, exprimé dans les cellules microgliales, a d'ailleurs été évoqué récemment dans les maladies neurodégénératives (pour revue : Iribarren et al., 2005). FPRL1 peut en effet être activé par un fragment de 42 acides aminés de la protéine β -amyloïde A ($A\beta_{42}$), dont la surproduction et la précipitation sous forme de plaques ou de fibrilles sont

impliquées dans la maladie d'Alzheimer. Le rôle du complexe FPRL1/A β_{42} serait double puisqu'il participerait à la persistance d'une activité proinflammatoire par activation et recrutement des phagocytes, et que son internalisation entraînerait la formation de fibrilles d'A β_{42} dans ces phagocytes (Cui et al., 2002; Le et al., 2001).

II-4 Signalisation intracellulaire en aval des récepteurs de chimioattractants

La première étape des voies de signalisation enclenchées par la stimulation des RCPGs est l'activation de la protéine G qui leur est associée. L'interaction entre un grand nombre de RCPGs et leur protéine G est dépendante du motif consensus E/DRY situé sur la face intracellulaire du troisième pilier transmembranaire du récepteur (Oliveira et al., 1994). Plusieurs études ont montré que le couplage des récepteurs de chimioattractants avec la protéine Gi₂ implique de multiples sites d'interaction, à la fois dans la boucle intracellulaire i1, sur la liaison entre les boucles intracellulaires i2 et i3 et au niveau de régions discrètes de la queue carboxyl-terminale (Bommakanti et al., 1995).

Les récepteurs de chimioattractants sont principalement couplés à une protéine G de type Gi₂ (Gierschik et al., 1989) et les fonctions du polynucléaire neutrophile induites par les chimioattractants sont inhibées par un traitement avec la toxine pertussique (PTX) de *Bordetella pertussis*, qui provoque une ADP-ribosylation spécifique des sous-unités α_i des protéines G hétérotrimériques de type Gi (Bokoch, 1995). Il a été montré que les récepteurs FPR et C5aR sont également capables de coupler avec les protéines Gi₁, G₀, et les protéines G insensibles à la PTX de type Gz et G₁₆ (Tsu et al., 1995).

Les voies de signalisation stimulées en aval des récepteurs de chimioattractants sont hautement complexes, une vue schématique et non exhaustive de ces voies est présentée en Figure 11. Après la dissociation de la sous-unité α , le dimère $\beta\gamma$ active la phospholipase C β_2 (PLC β_2) (Camps et al., 1992) et la phosphoinositide 3 kinase γ (PI3K γ) (Stoyanov et al., 1995). La PI3K γ convertit le phosphoinositol-4,5-bisphosphate (PIP₂) membranaire en phosphoinositol-3,4,5-triphosphate (PIP₃). La délétion de la PI3K γ chez la souris a révélé que cette enzyme est requise pour la migration dirigée des neutrophiles dans un gradient de peptide f-MLF (Hannigan et al., 2002) et pour la génération d'ions superoxyde initiée par la stimulation des récepteurs de chimioattractants (Hirsch et al., 2000). La PLC β_2 hydrolyse le

PIP₂ membranaire en diacylglycérol (DAG) et inositol triphosphate (IP₃). Ce dernier cause la libération du calcium des vésicules de stockage intracellulaires.

Le calcium et le DAG entraînent l'activation des isoformes de la protéine kinase C (PKC). Les neutrophiles et les cellules HL-60 différenciées vers un phénotype "neutrophile-like" expriment les isoformes classiques de la PKC, α , β I et β II, la nouvelle isoforme de PKC δ et l'isoforme atypique ζ (Tardif et al., 1998; Tsao et Wang, 1997). Les études pour déterminer quelles isoformes de PKC ont un rôle dans les fonctions du neutrophile sont assez contradictoires. Des études *in vitro* ou dans des systèmes reconstitués de génération d'ions superoxyde indiquent que certaines isoformes de PKC sont impliquées dans l'activation et la régulation de la NADPH oxydase.

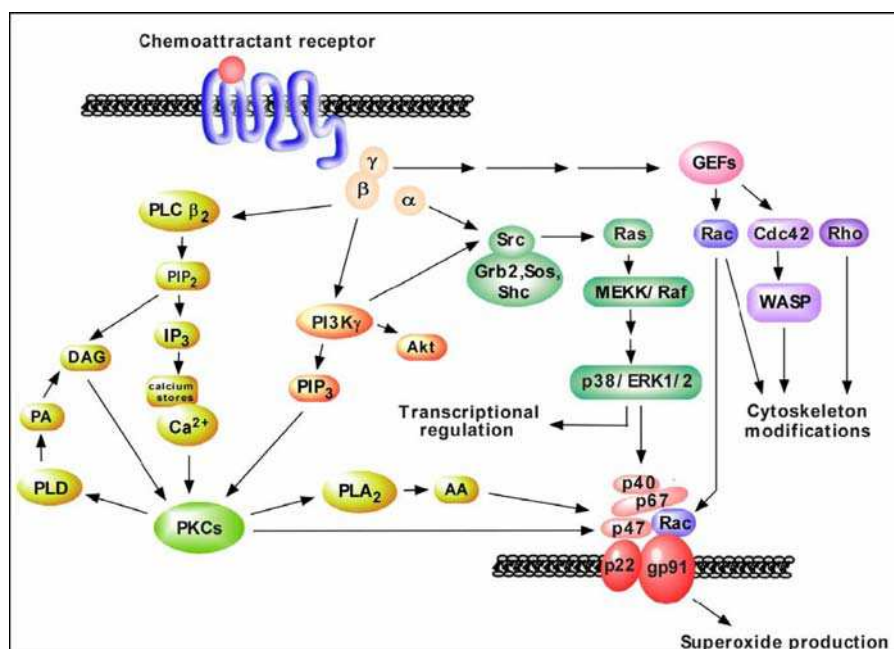


Figure 11 : Représentation schématique des voies de signalisation enclenchées par les récepteurs de chimioattractants

L'activation d'autres kinases est également intimement liée à la signalisation relative aux chimioattractants. Dans le neutrophile, les Mitogen-Activated Protein (MAP) kinases ERK1/2 (Extracellular signal-Regulated Kinases 1 et 2) et p38 sont activées par les chimioattractants. Ces deux voies de signalisation participent aux phénomènes d'adhérence, de chimiotactisme et de production d'ions superoxyde. La voie menant à l'activation de p38 n'est pas encore complètement élucidée alors que celle vers l'activation de ERK1/2 a été reconstituée (Lopez-Ilasaca et al., 1997). Le dimère $\beta\gamma$ de la protéine G recrute la PI3K γ à la membrane plasmique, augmentant ainsi l'activité des tyrosine kinases de la famille Src, qui

phosphorylent des protéines d'échafaudage comme la protéine adaptatrice Shc. L'association fonctionnelle entre Shc, Grb2 et la protéine SOS intervient alors et mène à l'activation de la voie Ras-Raf-MEK-ERK.

Les effecteurs intracellulaires couplés aux cascades de signalisation en aval des récepteurs de chimioattractants incluent entre autres, la phospholipase A₂-α, la phospholipase D, les MAP kinases et les kinases de la famille Src (Ma et al., 2000; Rane et al., 1997; Torres et al., 1993). La PLA₂-α est phosphorylée par les MAP kinases et elle est transférée à la membrane par un mécanisme dépendant du calcium (Lin et al., 1993). La PLA₂-α pourrait être requise pour l'activation de la NADPH oxydase car la production d'ions superoxyde est inhibée par traitement des cellules différenciées HL-60 avec des ARN antisens dirigés contre cette phospholipase. Le défaut résultant peut être compensé par l'addition d'acide arachidonique (Dana et al., 1998). Toutefois, ces résultats sont en contradiction avec une étude récente qui montre que la délétion du gène de la PLA₂-α chez la souris supprime totalement la libération d'acide arachidonique mais n'affecte pas la production d'ions superoxyde (Rubin et al., 2005).

La stimulation des récepteurs de chimioattractants mène à l'activation de GTPases monomériques, appelées protéines G de petite masse moléculaire, de la famille Rho (Rho, Rac et Cdc42), par l'intermédiaire de l'activation de protéines GEFs (Guanine-nucleotide Exchange Factors) comme Vav1 et pRex1 (Kim et al., 2003; Welch et al., 2002). Les GTPases de type Rho sont des régulateurs primordiaux des fonctions des leucocytes (pour revue : Sanchez-Madrid et del Pozo, 1999). RhoA serait impliqué dans l'adhésion dépendante des intégrines induite par les chimioattractants. La Rho-GTPase Rac2, dont l'expression est restreinte aux cellules hématopoïétiques, joue un rôle central dans la formation du complexe actif de la NADPH oxydase (pour revue : Dinauer, 2003). Les Rho-GTPases Rac1, Rac2 et Cdc42 sont impliquées dans le remodelage du cytosquelette d'actine. L'activation de Cdc42 serait responsable de la relaxation de la conformation auto-inhibitrice de la protéine WASP (Wiskott-Aldrich Syndrome Protein), une protéine à domaines multiples qui est un activateur du complexe de nucléation Arp2/3 (Machesky et Gould, 1999; Symons et al., 1996). Il a été montré que la queue cytoplasmique C-terminale du récepteur C5aR interagit avec WASP lorsque la conformation auto-inhibitrice est relâchée (Tardif et al., 2003). Cette interaction pourrait être un moyen pour ce récepteur de contrôler spatialement les sites de polymérisation de l'actine pendant la migration dirigée des leucocytes le long d'un gradient de C5a.

II-5 Régulation de l'activité des récepteurs de chimioattractants

La restriction et la localisation de l'activité de signalisation sont d'un grand intérêt pour la régulation des fonctions leucocytaires. Une modulation rapide de la signalisation au niveau du récepteur est en effet essentielle à la cellule pour percevoir les modifications infimes de concentration de chimioattractants lors de la migration dirigée le long du gradient chimiotactique. De même, l'atténuation de réponses leucocytaires comme la dégranulation ou la production d'ions superoxyde est d'une importance majeure dans le contrôle de l'inflammation et pour empêcher des dommages tissulaires trop importants.

II-5-1 Modulation de l'activité des récepteurs

De nombreuses études biochimiques suggèrent que les RCPGs peuvent former des structures dimériques ou multimériques (pour revues : Bai, 2004; Park et al., 2004). L'oligomérisation joue un rôle important dans le trafic des récepteurs et la régulation des voies de signalisation. De plus, l'hétéro-oligomérisation entre des récepteurs différents peut engendrer des nouvelles spécificités vis-à-vis des agonistes et contribuer à la modulation des fonctions des récepteurs. L'oligomérisation du récepteur C5aR est constitutive et semblerait jouer un rôle dans la biosynthèse et le transport du récepteur (Floyd et al., 2003). Le récepteur FPR a, quant à lui, été décrit comme ne formant pas de dimères (Gripentrog et al., 2003). L'hétéro-oligomérisation est également un moyen utilisé par la cellule pour moduler l'activité de certains récepteurs suite à la stimulation d'autres récepteurs, ce processus est apparenté à la désensibilisation hétérologue. Le récepteur de chimiokine CCR5 est par exemple phosphorylé et internalisé suite à la stimulation du récepteur C5aR, avec lequel il forme des hétéro-dimères (Huttenrauch et al., 2005).

II-5-2 L'inactivation des récepteurs

La terminaison de la réponse aux chimioattractants rend les cellules réfractaires à une seconde stimulation du même récepteur. Plusieurs mécanismes mutuellement non exclusifs peuvent participer à cette perte d'activité des récepteurs : la phosphorylation des récepteurs, leur interaction avec des molécules accessoires comme les β -arrestines et finalement leur internalisation.

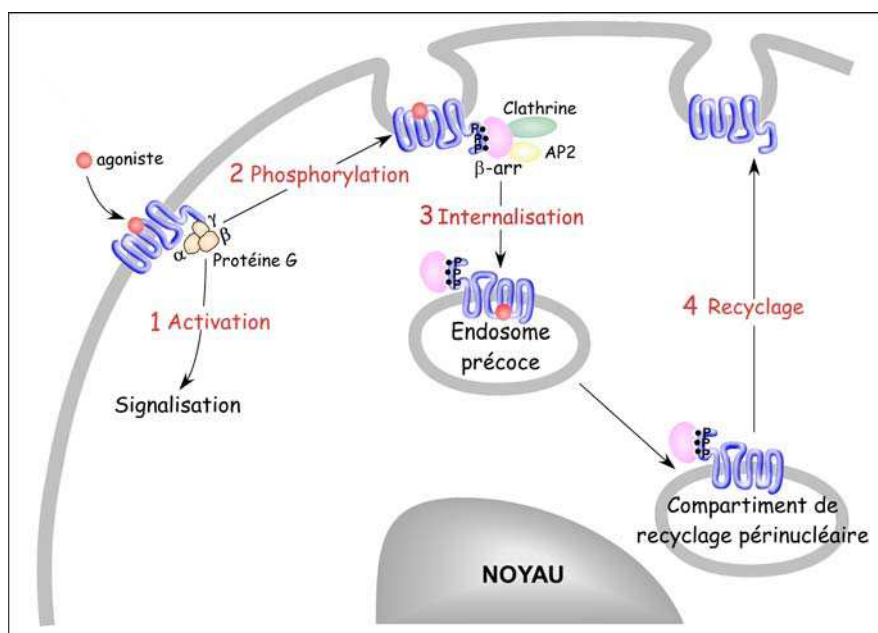


Figure 12 : Représentation schématique du trafic régulé des récepteurs de chimioattractants

Suite à leur phosphorylation, les récepteurs peuvent interagir avec les β -arrestines qui participent au processus d'endocytose par recrutement de la clathrine et de la protéine adaptatrice AP2. Après passage dans des vésicules d'endocytose, les récepteurs sont recyclés à la membrane plasmique dans un état fonctionnel.

II-5-2-1 Phosphorylation

La phosphorylation des récepteurs de chimioattractants est assurée majoritairement par des GRKs (GPCR Kinases) et par des protéines kinases de type PKC.

Le récepteur de l'anaphylatoxine C5a possède un site consensus de phosphorylation par la PKC (R-X-X-S-X-R-X) sur la troisième boucle intracellulaire. Sa phosphorylation est partiellement inhibée par des inhibiteurs de PKC (Tardif et al., 1993). Néanmoins, les sites majeurs de phosphorylation de ce récepteur sont restreints à sa région carboxyl-terminale (Giannini et al., 1995). La détermination de l'isoforme de GRK impliquée dans la phosphorylation du C5aR est encore controversée. Le C5aR est phosphorylé majoritairement sur des résidus sérines (Ser^{314} , Ser^{317} , Ser^{327} , Ser^{332} , Ser^{334} et Ser^{338}) (Giannini et al., 1995). La phosphorylation de ce récepteur fait appel à un processus hiérarchique (Christophe et al., 2000; Naik et al., 1997). La phosphorylation de l'une des deux paires de sérines $\text{Ser}^{332}/\text{Ser}^{334}$ ou $\text{Ser}^{334}/\text{Ser}^{338}$ est un prérequis pour la phosphorylation des autres sérines et elle est suffisante pour permettre l'internalisation du récepteur par la formation d'un complexe stable avec les β -arrestines jusque dans des vésicules intracellulaires (Braun et al., 2003). Une forme

mutante du récepteur C5aR non phosphorylable n'est pas internalisée (Naik et al., 1997) et induit une signalisation ainsi qu'une production d'ions superoxyde prolongées (Christophe et al., 2000).

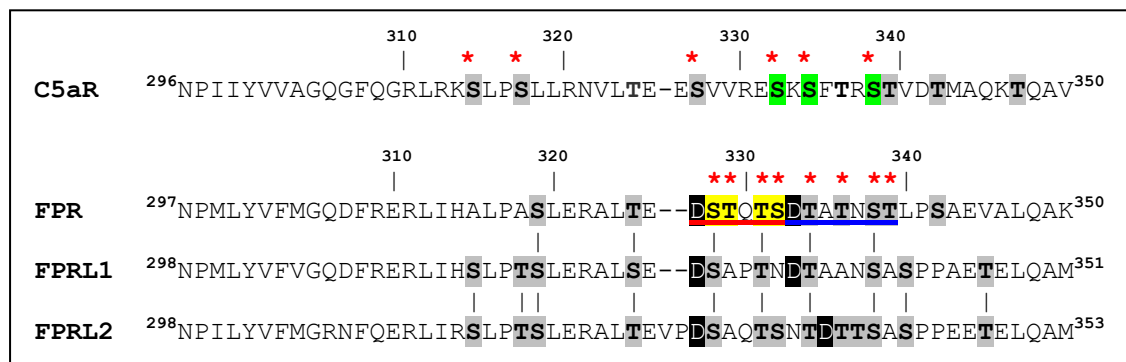


Figure 13 : Alignement des domaines C-terminaux de récepteurs de chimioattractants

Les résidus sérines et thréonines sont indiqués en gras sur fond gris. Les astérisques rouges indiquent, pour C5aR et FPR, les résidus phosphorylés de manière agoniste-dépendante, parmi lesquels ceux qui sont primordiaux pour la phosphorylation des autres résidus sont surlignés en vert et jaune. Les deux sites putatifs de phosphorylation par les GRK sont soulignés en rouge et bleu, ils sont précédés d'un acide aminé de caractère acide surligné en noir.

La queue C-terminale du récepteur FPR contient 11 sérines et thréonines. Ces deux types de résidus sont phosphorylés (Prossnitz et al., 1995). L'utilisation de mutants présentant un défaut de phosphorylation a conclu que huit de ces résidus, localisés entre les sérine S³²⁸ et thréonine T³³⁹, sont critiques pour l'internalisation et la désensibilisation du récepteur FPR (Maestes et al., 1999). Ces résidus sont répartis en deux domaines, contenant 4 sérines ou thréonines et précédés d'un acide aminé à caractère acide. Ceci est une caractéristique des sites de phosphorylation de type GRK (Onorato et al., 1991). Des études par mutagenèse dirigée ont montré que les résidus glutamine 326, aspartate 327 et aspartate 333 sont critiques pour la phosphorylation de FPR (Prossnitz et al., 1995). La phosphorylation du récepteur FPR n'est pas dépendante des PKC, des PKA ou des tyrosine kinases. La queue C-terminale de FPR peut être phosphorylée par les kinases GRK2 et GRK3, mais pas par GRK5 ou 6 (Prossnitz et al., 1995). La phosphorylation de FPR est un processus hiérarchique dans lequel la phosphorylation de sérines et thréonines adjacentes (Ser³²⁸/Thr³²⁹ ou Thr³³¹/Ser³³²) est requise pour la phosphorylation consécutive des autres sérines et thréonines. La phosphorylation des sérines 328, 332 et 338 est primordiale pour l'internalisation et l'interaction avec la β -arrestine 2 (Potter et al., 2006). Deux domaines de phosphorylation régulent de manière différente les affinités pour la β -arrestine et les agonistes (Key et al.,

2003). La phosphorylation des sérines et thréonines entre les résidus 328 et 332 détermine l'affinité du récepteur FPR pour la β -arrestine, alors qu'entre les résidus 334 et 339, elle conditionne la formation d'un complexe ternaire de haute affinité entre le récepteur, la β -arrestine et le ligand. Un défaut de phosphorylation du récepteur n'empêche pas l'interaction avec les β -arrestines mais il diminue fortement l'affinité entre ces deux partenaires.

Le récepteur FPRL1 est également phosphorylé de manière agoniste-dépendante (Christophe et al., 2001) mais peu de données sont connues sur la kinase qui le phosphoryle. Une étude des déterminants moléculaires responsables de sa phosphorylation est présentée dans ce document (cf. section C/I des Résultats et Discussions). Contrairement à FPR et FPRL1, FPRL2 est phosphorylé en absence de stimulation (Christophe et al., 2001).

Il est clairement établi que la phosphorylation des RCPGs mène à une interaction de forte affinité entre les récepteurs et les β -arrestines. Les β -arrestines interfèrent de façon stérique avec le couplage à la protéine G et ainsi désamorcent la signalisation émanant de la protéine G. Toutefois, ce concept est controversé dans le cas du FPR. Il a en effet été montré, dans un système reconstitué, que la phosphorylation du FPR peut bloquer l'interaction avec la protéine G indépendamment de son interaction avec les β -arrestines (Bennett et al., 2001).

II-5-2-2 Internalisation, trafic intracellulaire et recyclage

En plus de découpler le récepteur de sa protéine G, les β -arrestines participent à l'internalisation des récepteurs par le recrutement de molécules telles que la clathrine et la protéine adaptatrice AP2 (cf. § C/II-2). L'internalisation des récepteurs suite à leur stimulation est une manière efficace de diminuer le nombre de récepteurs en surface et donc de limiter la réponse à un agoniste après une première vague de stimulation ou lors d'une stimulation prolongée. L'endocytose par les puits mantelés de clathrine est la voie classiquement utilisée pour l'internalisation des récepteurs couplés aux protéines G. Elle fait également intervenir la dynamine, une GTPase qui joue un rôle dans la constriction du puits mantelé (pour revue : Damke, 1996).

Le récepteur FPR semble diverger du modèle standard. Il est capable d'utiliser des voies d'internalisation alternatives. Il a été montré que le récepteur FPR est internalisé dans les cellules HEK-293 par des mécanismes indépendants de la clathrine et de la dynamine (Gilbert

et al., 2001). De plus, FPR semble pouvoir être internalisé indépendamment de la présence des β -arrestines. L'utilisation d'un dominant négatif de la β -arrestine 1 ne perturbe pas l'internalisation du FPR (Gilbert et al., 2001). Des mutants de FPR partiellement phosphorylables qui n'interagissent pas avec les arrestines sont tout de même internalisés (Bennett et al., 2001). Enfin, le niveau d'internalisation du récepteur FPR n'est pas affecté dans des cellules MEF dérivés d'embryons de souris déficients pour les deux isoformes de β -arrestine (Vines et al., 2003).

Toutefois, ceci n'exclut pas la possibilité qu'une voie dépendante des β -arrestines soit impliquée dans le trafic endocytaire lorsque les β -arrestines sont présentes et s'associent avec le récepteur phosphorylé. Dans les cellules déficientes en β -arrestine, FPR est ciblé et piégé dans le compartiment de recyclage. La reconstitution des cellules avec l'une ou l'autre isoforme de β -arrestine restaure le phénotype classique de retour du récepteur à la membrane (Vines et al., 2003). Le recyclage semble donc être un mécanisme dépendant des β -arrestines, ce qui élargit le rôle des β -arrestines dans le trafic des récepteurs.

L'internalisation du récepteur FPRL1 suit une voie d'endocytose dépendante de la clathrine et de la dynamine. L'expression de dominants négatifs de ces protéines ou l'utilisation de siRNA dirigés contre la clathrine inhibent l'internalisation de FPRL1 (Ernst et al., 2004). Le récepteur FPRL1 internalisé co-localise avec Rab11, ce qui indique un passage du récepteur par le compartiment de recyclage. Toutefois, une voie alternative de recyclage dépendante de la PI3K et contournant le compartiment de recyclage a également été observée (Ernst et al., 2004). La dépendance de l'internalisation de FPRL1 vis-à-vis des β -arrestines n'a pas encore été démontrée, une partie des travaux présentés ci-après est focalisée sur cette problématique (cf. section C/II des Résultats et Discussions).

C/ Les β -arrestines

I- Historique

I-1 L'arrestine visuelle

L'arrestine visuelle, encore appelée "**antigène S rétinien**" ou "**protéine 48-kDa**", est une protéine soluble abondante, localisée dans les cellules photoréceptrices de type "bâtonnets" de la rétine. Cette protéine est reliée à de nombreuses affections rétinienne humaines de nature inflammatoire, telles que l'uvéorétinite, maladie auto-immune expérimentale induite par injection de l'antigène S rétinien (Wacker et al., 1977). Hermann Kühn a pu montrer que la protéine 48-kDa se fixe aux disques des segments externes des bâtonnets après illumination (Kuhn, 1978), et ce, de façon sélective sur la rhodopsine photoactivée et phosphorylée (Kuhn et al., 1984). La rhodopsine, une protéine à 7 hélices transmembranaires, est le récepteur de la vision. Elle se lie à la transducine, une protéine G hétérotrimérique qui active en aval la cGMP (Guanosine MonoPhosphate cyclique) phosphodiésterase. En se fixant à la rhodopsine phosphorylée, la protéine 48-kDa bloque l'interaction avec la transducine et en conséquence la signalisation en aval. C'est cette propriété d'arrêt du signal qui a donné le nom d'**arrestine** (arrestine 1 ou arrestine visuelle) à cette protéine de 48 kDa (Wilden et al., 1986; Zuckerman et Cheasty, 1986). La forme bovine de l'arrestine visuelle a été clonée et séquencée entièrement en 1987 (Shinohara et al., 1987). Un homologue de cette arrestine visuelle a pu être identifié dans les cônes rétiens, cette **arrestine de cône** (arrestine 4 ou arrestine C) présente 50% d'identité avec l'arrestine visuelle (Craft et al., 1994; Murakami et al., 1993).

I-2 Découverte des β -arrestines

Les β -arrestines tiennent leur nom du contexte de leur découverte, elles ont en effet été mises en évidence pour la première fois dans le processus de désensibilisation du récepteur β_2 -adrénergique (β_2 AR). Ce récepteur à 7 hélices transmembranaires est phosphorylé par une GRK de manière dépendante de l'agoniste et perd alors son activité fonctionnelle vis-à-vis de la protéine G. Il est désensibilisé. Des essais de reconstitution à partir des composants purifiés (récepteur, protéine G et kinase GRK purifiés et rassemblés dans des vésicules

phospholipidiques) ont montré que, paradoxalement, plus le taux de purification de la kinase était important, moins le récepteur était désensibilisé. L'ajout d'arrestine visuelle à cette préparation était capable de restaurer la désensibilisation (Benovic et al., 1987). Les chercheurs du groupe du Dr. R.J. Lefkowitz ont donc émis l'hypothèse qu'il existait une protéine ubiquiste, analogue à l'arrestine visuelle, capable de réguler l'activité du récepteur β_2 AR. L'ADN codant cette protéine a été cloné en 1990 par criblage d'une banque de cerveau bovin avec pour appât une sonde codant l'arrestine visuelle. La protéine traduite résultante de 418 acides aminés, homologue à l'arrestine visuelle, a naturellement été dénommée **β -arrestine** (également appelée β -arrestine 1 ou arrestine 2) et est en effet capable d'inhiber l'activité du récepteur β_2 -adrénergique phosphorylé (Lohse et al., 1990).

L'ADNc de la β -arrestine 1 humaine a été cloné dans le groupe du Dr. De Blasi en 1993 et deux isoformes d'épissage alternatif ont pu être identifiées (β -arrestine 1A et 1B) (Parruti et al., 1993). Un dernier membre de la famille arrestine a été cloné à partir d'une banque d'ADNc de thyroïde humaine (Rapoport et al., 1992). Cette protéine, qui est capable d'inhiber l'activité du récepteur β_2 AR phosphorylé, et qui présente 78% d'identité avec la β -arrestine 1, fut appelée **β -arrestine 2** (ou arrestine 3) (Attramadal et al., 1992).

II- Description des β -arrestines

II-1 Description générale

Les β -arrestines sont des protéines cytosoliques distribuées de façon ubiquiste dans tous les tissus et types cellulaires, notamment les tissus neuronaux, la rate, les poumons et les lymphocytes (Attramadal et al., 1992 ; Lohse et al., 1990; Parruti et al., 1993). Il existe un fort degré d'identité entre les représentants de la famille "arrestine" (Figure 15).

Ces protéines sont présentes chez de nombreux organismes, du ver *Caenorhabditis elegans* aux mammifères en passant par la mouche et le limule, un arthropode survivant de la préhistoire. Elles sont phylogénétiquement très conservées, comme le présente l'alignement de séquences protéiques d'arrestines chez l'humain, le bovin et la mouche drosophile en Figure 14.

β -ARR1	BOVIN	-----MGDK-GTRVFKKASPNGKLTVYLGKRDVFDHIDLVEPVDGVVLVDPEYLK-ER
β -ARR1	HUMAN	-----MGDK-GTRVFKKASPNGKLTVYLGKRDVFDHIDLVDPVVDGVVLVDPEYLK-ER
β -ARR2	HUMAN	-----MGEKPGTRVFKKSSPNCKLTVYLGKRDVFDHLDKVDPVVDGVVLVDPPDYLK-DR
v-ARR	HUMAN	MAASGKTSKSEPNHVIFFKKTISRDKSVTIYLGNRDYIDHVSQVQPVVDGVVLVDPDLVK-GK
c-ARR	HUMAN	-----MSKVFKKTSSNGKLSIYLGKRDVFDHVDVTEPIDGVVLVDPEYLK-CR
ARR1	DROSO	-----MVVNFVKVFKKCSNNMITLYMNRDFVDSVTQVEPIDGIIVLDDDEYVRQNR
β -ARR1	BOVIN	RVYVTLTCAFRYGRDLDVLGLTFRKDLFVANVQSFPAPEDKK-PLTRLQERLIKKLGE
β -ARR1	HUMAN	RVYVTLTCAFRYGRDLDVLGLTFRKDLFVANVQSFPAPEDKK-PLTRLQERLIKKLGE
β -ARR2	HUMAN	KVFVTLTCAFRYGRDLDVLGLSFRKDLFIATYQAFPPVENPPR-PPTRLQDRLLRKLQ
v-ARR	HUMAN	KVYVTLTCAFRYQEDIDVIGLTFRRDLYFSRVQVPPVGAAS--PTKLQESLLKKLGS
c-ARR	HUMAN	KLFVMTLCAFRYGRDDLEVIIGLTFRRDLYVQTLQVPAESSSPQGPLTVLQERLLHKLGD
ARR1	DROSO	KIFVQLVCNFRYGRDDEMIGLRFQKELTLVSQQVCPQKQDIQ--LTKMQERLLKKLGS
β -ARR1	BOVIN	HAYPFTFEIPPNLPCSVTLQPGPEDTGKACGVDEYKAFCAENL---EEKIHKRNSVRLV
β -ARR1	HUMAN	HAYPFTFEIPPNLPCSVTLQPGPEDTGKACGVDEYKAFCAENL---EEKIHKRNSVRLV
β -ARR2	HUMAN	HAHPFFFTIPQNLPCSVTLQPGPEDTGKACGVDFEIRAFCAKSL---EEKSHKRNSVRLV
v-ARR	HUMAN	NTYPFLLTFPDYLPQSVMLQAPQDSGKSCGVDFEVKAFATDSTDAEDKIPKKSSVRL
c-ARR	HUMAN	NAYPFTLQMTNLPQSVTLQPGPEDAGKPCGIDFEVKSFCENP---EETVSKRDYVRLV
ARR1	DROSO	NAYPFVMQMPSSPASVVLQKASDESQPCGVQYFVKITFTGDS---CDRSHRRSTINLG
β -ARR1	BOVIN	IRKVQYAFERPGPQPTAETTRQFLMSDKPLHLEASLDKEIYYHGEPISVNVHVTNNTNKT
β -ARR1	HUMAN	IRKVQYAFERPGPQPTAETTRQFLMSDKPLHLEASLDKEIYYHGEPISVNVHVTNNTNKT
β -ARR2	HUMAN	IRKVQFAPEKPGPQPSAETTRHFLMSDRSLHLEASLDKELYYHGEPINNVHVTNNTNKT
v-ARR	HUMAN	IRKVQHAPLEMGPQPRAEAAQFFMSDKPLHLAVSLNKEIYFHGEPIPVTVTNNTNTEKT
c-ARR	HUMAN	VRKVQFAPEAGPGPSAQTIIRFLLSAQELQLQAWMDREVHYHGEPISVNVINNCTNKV
ARR1	DROSO	IRKVQYAPTQGIQPCTVVRKDFLLSPGELELEVTLQYHHGEPISVNICVRNNSNKV
β -ARR1	BOVIN	VKKIKISVRQYADICLFNTAQYKCPVAMEEADD--TVAPSSSTFCKVYTLTPFLANNREKR
β -ARR1	HUMAN	VKKIKISVRQYADICLFNTAQYKCPVAMEEADD--TVAPSSSTFCKVYTLTPFLANNREKR
β -ARR2	HUMAN	VKKIKISVRQYADICLFNTAQYKCPVAMEEADD--QVSPSSSTFCKVYTLTPFLANNREKR
v-ARR	HUMAN	VKKIKAEVQVANVLYSSDYVVKPVAMEEAAQ--KVPPNSTLTKTTLTPFLANNRERR
c-ARR	HUMAN	IKKIKISVDQITDVVLYSLDKYTKTVFIQEFTE--TVAANSFSQSFAVTPFLAASCQKR
ARR1	DROSO	VKKIKAMVQGVDDVLFQNGQFRNTIAFMETSEGCPNPGSSSLQKVMYLVETLVANCDRA
β -ARR1	BOVIN	GLALDGKIKHEDTNLASSTLLREGANREILGIIVSYKVKVVLVSRGGLGLDLASSDVAV
β -ARR1	HUMAN	GLALDGKIKHEDTNLASSTLLREGANREILGIIVSYKVKVVLVSRGGLGLDLASSDVAV
β -ARR2	HUMAN	GLALDGKIKHEDTNLASSTIVKEGANKEVLGILVSYKVKVVLVSRGGLGLDLASSDVAV
v-ARR	HUMAN	GIALDGKIKHEDTNLASSTIIKEGIDRTVLGILVSYQIKVKLTVS--GFLGELTSSSEVAT
c-ARR	HUMAN	GLALDGKIKHEDTNLASSTIIRPGMDKELLGILVSYKVRVNLVMSCGGILGLDLTASDVGV
ARR1	DROSO	GIAVEGDIKRKDTALASTLIASQDARDAFGIIVSYAVKVKLFLGALG-----GELCA
β -ARR1	BOVIN	ELPFTLMHPKPKKEEP-----PHREVPEHETPVDTNLIELDTN---DDDIVFEDFARQR-LK
β -ARR1	HUMAN	ELPFTLMHPKPKKEEP-----PHREVPEHETPVDTNLIELDTN---DDDIVFEDFARQR-LK
β -ARR2	HUMAN	ELPFVLMHPKPHDHIPLRPQSAAPETDVPVDTNLIETDNYATDDDIVFEDFARLR-LK
v-ARR	HUMAN	EVPERLMHPQPED-----PAKESYQ-----DANLVFEFARHNLKD
c-ARR	HUMAN	ELPLVLIHFKP-----SHEAAS-----SEDIVIEEFTRKGEES
ARR1	DROSO	ELPFTLMHPKPK-----SRKAQLE
β -ARR1	BOVIN	GMKDDKEEEEEDGTGSPRLNDR
β -ARR1	HUMAN	GMKDDKEEEEEDGTGSPQLNDR
β -ARR2	HUMAN	GMKDDDYDDQLC-----
v-ARR	HUMAN	AGEAEEGKRDKNDVDE-----
c-ARR	HUMAN	SQKAVEAEGDEGS-----
ARR1	DROSO	AEGSIEA-----

Figure 14 : Alignement de protéines de la famille "arrestine"

Alignement généré par le logiciel ClustalW. Numéros d'accèsion Uniprot : β -arrestine 1 bovine (P17870), β -arrestine 1 (P49407), β -arrestine 2 (P32121), arrestine visuelle (P10523) et arrestine de cône (P36575) humaines et arrestine I de *Drosophila melanogaster* (P15372).

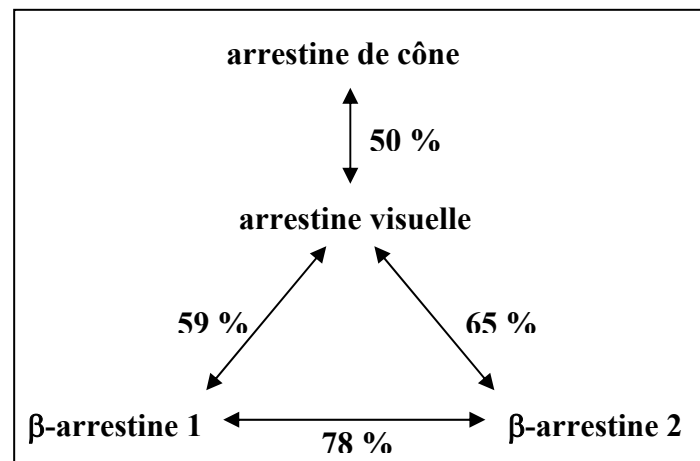


Figure 15 : Identité des membres de la famille des arrestines humaines

II-2 Caractéristiques des deux isoformes de β -arrestine

β-ARR1	HUMAN	MCDK-GTRVFKKASPNGKLTVYLGKRDVDHLDLVDVPDGVVLVDPEYLKERRVYVTLTC
β-ARR2	HUMAN	MCEKPGTRVFKKSSPNCKLTVYLGKRDVDHLDKVDVPDGVVLVDPDYLDKDKVVFVTLTC
β-ARR1	HUMAN	AFRYGREDLDVLGLTFRKDLFVANVQSFPAPEDKKPLTRLQERLIKKLGEHAYPFTFEI
β-ARR2	HUMAN	AFRYGREDLDVLGLSFRKDLFIATYQAFPPVNPPRPPTRLQDRLLRKLGQHAPHFFFTI
β-ARR1	HUMAN	PPNLPCSVTLQPGPEDTGKACGVDEYVKAFAENLEEKIHKRNSVRLVIRKVQYAPERPG
β-ARR2	HUMAN	PQNLPCSVTLQPGPEDTGKACGVDFEIRAFCAKSLEEKSHKRNSVRLVIRKVQFAPEKPG
β-ARR1	HUMAN	PQPTAETTRQFLMSDKPLHLEASLDKEIYYHGEPISVNVHVTNNTNKTVKKIKISVRQYA
β-ARR2	HUMAN	PQPSAETTRHFLMSDRSLHLEASLDKELYHGEPLNVNVHVTNNTNKTVKKIKVSVRQYA
β-ARR1	HUMAN	DICLFNTAQYKCPVAMEEADDTVAPSSSTFCKVYTLTPFLANNREKRGLALDGLKHKHEDTN
β-ARR2	HUMAN	DICLFSTAQYKCPVAQLEQDDQVSPSSSTFCKVYTTITPLSDNREKRGLALDGLKHKHEDTN
β-ARR1	HUMAN	LASSTLLREGANREILGIIVSYKVKVKLVVSRGGLLGDLASSDVAVELPFTLMHPKPKEE
β-ARR2	HUMAN	LASSTIVKEGANKEVVGILVSYRVKVKLVVSRGG-----DVSVELPFVLMHPKPHDH
β-ARR1	HUMAN	P----PHREVPENETPVDTNLIELDTN----DDDIVFEDFARQLKGMKDDKEEEDGTS
β-ARR2	HUMAN	IPLRPQSAAPEITDVPVDTNLIEFDTNATDDDIVFEDFARLRKGMKDDYDDQLC---
β-ARR1	HUMAN	PQLNNR 418
β-ARR2	HUMAN	----- 409

Figure 16 : Alignement des deux isoformes de β -arrestines humaines

Alignement généré par le logiciel ClustalW. Numéros d'accèsion Uniprot : β -arrestine 1 (P49407) et β -arrestine 2 (P32121). Le fragment d'épissage alternatif de la β -arrestine 1 est surligné en en vert, les sites de phosphorylation (S⁴¹² & T³⁸²) en mauve, et le signal d'export nucléaire de la β -arrestine 2 en bleu.

Bien que les β -arrestines partagent un fort degré d'homologie, il existe tout de même des différences de régulation et de fonction dues à des dissemblances dans leurs séquences. La principale différence entre les isoformes 1 et 2 de β -arrestine tient à deux séquences d'acides

aminés (335-342 et 410-418) de la partie C-terminale de la β -arrestine 1 absents de la β -arrestine 2 (Figure 16). Il est également intéressant de noter que l'un de ces deux fragments, le fragment 335-342, correspond exactement au fragment caractérisant l'épissage alternatif entre les β -arrestines 1A et 1B (Parruti et al., 1993).

L'activité de la β -arrestine 1 est régulée, en partie, par l'état de phosphorylation de la sérine 412. Cette sérine est phosphorylée constitutivement et déphosphorylée dans la conformation active de la β -arrestine 1. Cette déphosphorylation n'est pas requise pour l'interaction avec le récepteur ni sa désensibilisation mais elle est indispensable au rôle de la β -arrestine 1 dans l'internalisation des récepteurs (Lin et al., 1997). Quant à la phosphorylation, elle serait assurée par les MAP kinases ERK1/2 qui garantiraient un contrôle inhibiteur en retour sur la β -arrestine 1 (Lin et al., 1999). La β -arrestine 2 ne comporte que 409 acides aminés (donc pas de sérine en position 412) mais elle présente un autre site de phosphorylation. Il s'agit de la thréonine 382, phosphorylée constitutivement par la caséine kinase II et qui est déphosphorylée dans la forme active de la protéine. Toutefois, contrairement à la sérine 412 pour la β -arrestine 1, le cycle de phosphorylation de la thréonine 382 ne semble pas crucial aux fonctions de la β -arrestine 2 (Kim et al., 2002).

La β -arrestine 2 semble également être régulée par ubiquitination (Perroy et al., 2004; Shenoy et al., 2001). Des travaux approfondissant ces études ont montré que l'intensité de l'ubiquitination est dépendante de la stimulation du récepteur et qu'elle affecte le profil d'internalisation et de signalisation du récepteur (Shenoy et Lefkowitz, 2005). Les lysines ubiquitinées seraient différentes selon la conformation active de la β -arrestine. La conformation adoptée dépend, elle-même, directement du type de récepteur stimulé. Ainsi, la β -arrestine 2 présenterait un "*code lysine*" spécifique du type de récepteur activé qui déterminerait le profil de régulation de l'activité de ce type de récepteur.

Une autre différence importante entre les β -arrestines tient à leur localisation subcellulaire. En effet, bien que ces protéines soient toutes deux cytosoliques, la β -arrestine 1 est distribuée de manière uniforme à travers l'ensemble de la cellule, alors que la deuxième isoforme est absente du noyau. Les β -arrestines sont en fait capables de pénétrer le noyau mais seule la β -arrestine 2 possède un signal d'export nucléaire (NES). Ce signal d'export

nucléaire est un NES classique riche en leucine et implique les leucines 395 et 397 (Scott et al., 2002b). La β -arrestine 2 connaîtrait en fait un transport nucléocytoplasmique actif et régulé, où elle servirait de navette en entraînant avec elle des effecteurs nucléaires, telle que la Jun kinase 3.

Il paraît donc de plus en plus évident que, bien qu'elles soient très homologues et se lient toutes deux aux RCPGs activés, les deux isoformes de β -arrestine n'aient pas des fonctions redondantes. D'autres exemples viendront étayer cette constatation dans les paragraphes suivants.

II-3 Données structurales sur les β -arrestines

La première structure cristallographique des β -arrestines a été révélée en 2001 avec une résolution de 1,9 Å (Han et al., 2001). Il s'agissait de la β -arrestine 1 bovine sous deux formes inactives tronquées (acides aminés 1-393 et 1-382). La structure de la protéine entière a été résolue par Benovic et ses collaborateurs une année plus tard (Milano et al., 2002). La structure de la β -arrestine 2 n'a pas été résolue de façon cristallographique mais, étant donné le haut degré d'homologie entre les deux isoformes de β -arrestine, elle a été modélisée sur la base de la structure cristallographique de la β -arrestine 1. La structure globale des β -arrestines est très similaire à celle de l'arrestine visuelle (Granzin et al., 1998; Hirsch et al., 1999).

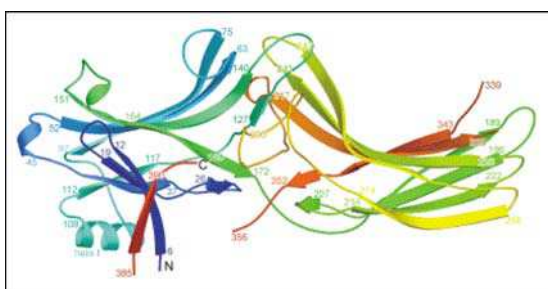


Figure 17 : Structure de la β -arrestine 1 bovine, diagramme en ruban

(Han et al., 2001)

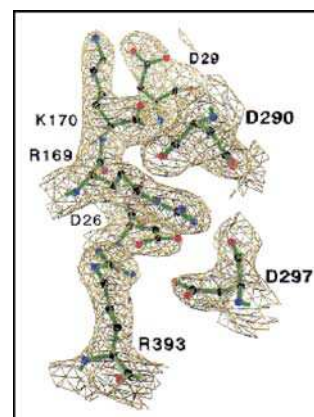


Figure 18 : Carte de densité électronique du corps polaire de la β -arrestine 1 bovine

Le corps polaire est composé des acides aminés aspartates D²⁶, D²⁹⁰ et D²⁹⁷, arginines R¹⁶⁹ et R³⁹³ et lysine K¹⁷⁰ (Milano et al., 2002).

Les β -arrestines sont des molécules assez allongées (dimensions 95x50x45 Å) présentant des domaines N- et C-terminaux faits de feuillets bêta antiparallèles, tous deux reliés par une charnière appelée le **corps central polaire** et comprenant la queue C-terminale qui est confinée entre les deux domaines (Figure 17 et Figure 18). Le domaine N-terminal présente une hélice α courte le long de la face convexe de la molécule. L'ensemble de ces domaines s'agence dans une conformation dite "inactive" où la molécule présente une structure assez déployée et ouverte (Figure 19). Cette conformation inactive est maintenue par des ponts salins, composés d'acides aminés chargés et enfouis dans le corps polaire intact (Milano et al., 2002), ainsi que par l'"**interface à 3 éléments**", basée sur des interactions hydrophobes entre des structures secondaires, la petite hélice α amphipatique H I (a.a. 98 à 108), le feuillet β I en partie N-terminale et le feuillet β XX en partie C-terminale (Han et al., 2001).

Le passage d'une conformation inactive à une conformation active des β -arrestines est induit par l'interaction avec les récepteurs couplés aux protéines G activés et phosphorylés sur leur queue C-terminale cytoplasmique. Ce changement de conformation a pu être caractérisé par des expériences de protéolyse limitée où certains acides aminés de la β -arrestine 2 voient leur accessibilité à la protéase modifiée après activation par un phosphopeptide dérivé de la queue C-terminale du récepteur de la vasopressine (Xiao et al., 2004). Ainsi, lors de l'activation de la β -arrestine 2, l'interaction des phosphates du récepteur activé avec les charges positives du corps polaire induit une perturbation du réseau de charges de ce corps polaire et la libération de la partie C-terminale de la β -arrestine hors du corps polaire central vers l'extérieur de la protéine (Figure 19). La conséquence la plus évidente de ce changement de conformation est une meilleure accessibilité du site de liaison à la clathrine situé sur la partie C-terminale de la β -arrestine (cf. § III-2 pour plus de détails), l'affinité de la β -arrestine pour la clathrine est alors accrue de dix fois.

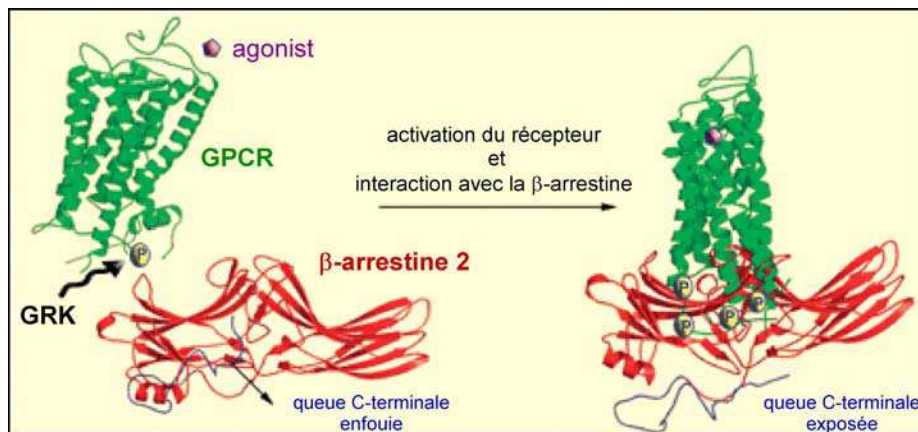


Figure 19 : Modèle structural des changements conformationnels de la β -arrestine 2 suite à l'activation par un RCPG phosphorylé (d'après Lefkowitz et Shenoy, 2005)

Ce changement de conformation a été utilisé pour faire de la β -arrestine un biosenseur de l'activité des RCPGs applicable aux biotechnologies, notamment au criblage à haut débit de molécules pharmacologiquement actives sur les RCPGs. L'équipe du Dr. Michel Bouvier à Montréal a réalisé une construction de β -arrestine fusionnée à des protéines fluorescentes en position N- et C-terminale qui permet de mesurer un signal de BRET intramoléculaire lorsqu'un changement de conformation de la β -arrestine est induit par l'activation d'un récepteur (Charest et al., 2005).

II-4 Etat oligomérique des β -arrestines

L'état oligomérique des β -arrestines est à l'heure actuelle toujours sujet à controverse. Alors que la structure cristallographique de l'arrestine visuelle faisait état d'un tétramère composé de deux dimères asymétriques (Granzin et al., 1998; Hirsch et al., 1999), les premières données cristallographiques relatives à la β -arrestine 1 laissaient plutôt envisager un état monomérique de la β -arrestine (Han et al., 2001; Milano et al., 2002).

En effet, la β -arrestine 1 sous sa forme entière a été caractérisée en tant que monomère en solution et en cristal. Les auteurs ont alors supposé que, la concentration des β -arrestines dans les cellules non-visuelles étant bien plus faible que celle de l'arrestine visuelle dans la rétine, les conditions de promiscuité n'étaient pas réunies pour favoriser l'oligomérisation des β -arrestines. Toutefois, ils n'ont pas réfuté l'hypothèse qu'une oligomérisation puisse intervenir lorsque les β -arrestines sont ciblées à la membrane où leur concentration serait alors localement forte. L'oligomérisation décelée dans les cristaux des formes tronquées en C-

terminal de la β -arrestine 1 pourrait étayer cette hypothèse, par le fait que ces formes tronquées mimeraient la conformation activée des β -arrestines à la membrane où la queue C-terminale est sortie de la protéine. Toutefois, les interfaces de dimérisation caractérisées dans ces cristaux ("tail-to-tail") ne correspondent en rien à celles identifiées pour l'oligomérisation de l'arrestine visuelle ("head-to-tail") et relèvent donc peut-être d'artefacts inhérents à la cristallisation.

Des données récentes prouvent pourtant que les β -arrestines existaient, au moins en partie, à l'état d'oligomères dans la cellule. L'équipe du Dr. Stefano Marullo a pu montrer par des approches biochimiques (co-immunoprécipitation) et biophysiques (BRET et FRET) que les β -arrestines forment de façon constitutive dans la cellule des homo- et hétéro-oligomères (Storez et al., 2005). Une autre équipe a pu montrer de manière plus précise que cette oligomérisation était dépendante des phosphoinositides, ceci par cristallisation de la β -arrestine 1 en présence d'inositol hexakisphosphate (IP₆) (Milano et al., 2006). Une molécule d'IP₆ servirait alors de ligand à deux molécules d'arrestine, l'une interagissant avec l'IP₆ par un site de liaison de forte affinité dans son domaine C-terminal et l'autre par un site de liaison de faible affinité au sein de son domaine N-terminal. A cette occasion, il a également été montré que les formes oligomériques seraient plutôt cytoplasmiques alors que les monomères seraient retrouvés dans le noyau. L'oligomérisation serait donc utile à la localisation et aux fonctions des β -arrestines. L'IP₆, qui est cytosolique, piègerait les β -arrestines sous forme d'oligomères cytosoliques et serait un régulateur négatif des interactions des β -arrestines avec la membrane plasmique.

III- Fonctions des β -arrestines

L'utilisation de la recombinaison homologue chez la souris a permis de construire des modèles de souris transgéniques déficientes en β -arrestine et d'étudier les phénotypes résultants (Bohn et al., 1999; Conner et al., 1997). Les souris déficientes pour l'une ou l'autre isoforme de β -arrestine sont viables, par contre, l'absence des deux isoformes est létale au stade embryonnaire (Kohout et al., 2001). Ceci suggère que ces protéines sont indispensables au fonctionnement de l'organisme et, qu'à un certain niveau, chaque isoforme peut se substituer à l'autre. Néanmoins, les rôles des deux isoformes ne sont pas toujours redondants.

Les souris déficientes en β -arrestine 1 présentent une altération de la réponse cardiaque à une stimulation du récepteur β_2 -adrénergique (Conner et al., 1997). L'effet analgésique de la morphine, qui agit sur le récepteur μ -opioïde, est accru et prolongé chez les souris déficientes pour la β -arrestine 2 (Bohn et al., 1999). Ces deux phénotypes sont reliés à une désensibilisation altérée de récepteurs couplés aux protéines G.

III-1 Découplage du récepteur à la protéine G

Depuis la première mise en évidence d'une interaction entre un récepteur phosphorylé et une arrestine, en l'occurrence la rhodopsine photoactivée et l'arrestine visuelle (Kuhn et al., 1984), et l'arrêt d'activation de la protéine G résultant de cette interaction, de nombreux travaux ont été réalisés afin d'étendre ce modèle aux autres récepteurs couplés aux protéines G et de mieux comprendre ses mécanismes.

III-1-1 Protéines G et arrestines

Il est intéressant de noter que les arrestines (arrestine visuelle, de cône ou β -arrestines) possèdent plusieurs domaines d'homologie avec les sous-unités α des protéines G, notamment avec le domaine C-terminal des $G\alpha$, domaine impliqué dans le couplage au récepteur (Figure 20). Cette propriété pourrait indiquer que les sites de liaison du récepteur avec les arrestines et avec les protéines G se chevaucheraient, au moins en partie.

Par exemple, dans le cadre des cellules photoréceptrices, il existe une forte homologie de séquence entre les fragments 373-393 de l'arrestine visuelle et les 25 résidus C-terminaux de la transducine α_1 (d'après Wistow et al., 1986). Ce domaine C-terminal de $G\alpha$ présente le site de reconnaissance d'ADP-ribosylation par la PTX, il a donc probablement une importance fonctionnelle pour l'interaction avec le récepteur. Toutefois, les arrestines ne présentent pas de cystéine dans ce site de reconnaissance par la PTX et ne peuvent donc pas connaître d'ADP-ribosylation. Par ailleurs, les séquences 379-388 et 377-389 des β -arrestines 1 et 2, respectivement, présentent des similitudes avec un fragment très conservé des sous-unités $G\alpha$ ($G\alpha_s$ ou $G\alpha_{i2}$) important pour le couplage au récepteur. Il en va de même pour la séquence GK(Q)LKHEd des β -arrestines très homologues à un fragment des sous-unités $G\alpha_s$ absent des $G\alpha_i$ et potentiellement impliqué dans la liaison des $G\alpha_s$ au récepteur (Lohse et al.,

1990). Ainsi, les β -arrestines pourraient mimer les protéines $G\alpha$ et donc se lier à leur place aux récepteurs couplés aux protéines G. Ce mimétisme étant plus marqué pour les $G\alpha_s$ que pour les $G\alpha_i$, il pourrait y avoir une préférence d'interaction (ou du moins un comportement différent) des β -arrestines pour les RCPGs couplés aux protéines G_s .

	transducine α_1	325-QNVKFFVFD	AVTDIIKENLKD	CGLF-349	
	vis-arrestine	373-QDANLVFEE	----FARHNLKD	AGEA-393	
β -arr1	379-LDTN---	DDDIVF-	388	291-GKLVKHE	-297 β -arr1
β -arr2	377-FDTNYAT	DDDIVF-	389	293-GQLKHED	-299 β -arr2
$G\alpha_s$	367-VDTE---	NIRRVF-	376	304-GKSKIED	-310 $G\alpha_s$
$G\alpha_{i2}$	327-TDTK---	NVQFVF-	336	-----	$G\alpha_i$

Figure 20 : Homologies entre les arrestines et les protéines G

Numéros d'accès Uniprot : arrestine visuelle (P10523), β -arrestine 1 (P49407), β -arrestine 2 (P32121), transducine α_1 (P11488), $G\alpha_s$ (P63092) et $G\alpha_{i2}$ (P04899) humaines

Récemment, les affinités de la protéine G transducine ou de l'arrestine visuelle avec la rhodopsine ont été quantifiées et comparées (Gibson et al., 2000). Les constantes d'affinité de la transducine et de l'arrestine pour la rhodopsine varient selon la phosphorylation du récepteur. L'affinité de la protéine G diminue tandis que celle de l'arrestine augmente pour chaque phosphate ajouté sur la rhodopsine. Jusqu'à une stoechiométrie de deux phosphates par molécule de rhodopsine, la protéine G interagit mieux que l'arrestine avec le récepteur. A des niveaux de phosphorylation supérieurs, c'est la fixation de l'arrestine qui est favorisée.

L'ensemble de ces données comparatives entre arrestines et protéines G, qu'elles soient structurales ou biochimiques, convergent vers une idée consensus où les interactions du récepteur avec les β -arrestines ou les protéines G seraient mutuellement exclusives ; ce qui expliquerait comment la fixation de l'arrestine participe au découplage de la protéine G de son récepteur et, par voie de conséquence, à l'arrêt de l'activation de la protéine G.

III-1-2 Interaction entre récepteur et arrestines

Il a été clairement établi que l'interaction entre les arrestines et les récepteurs couplés aux protéines G est dépendante de la phosphorylation du récepteur. Toutefois, cette condition nécessaire n'est pas suffisante. Il a été montré dans le groupe du Dr. Eric Prossnitz, à

l'exemple du récepteur FPR, que le domaine "DRY" conservé parmi les RCPGs, est essentiel pour le couplage de l'arrestine au récepteur phosphorylé. Le mutant R123G du récepteur FPR qui garde la capacité d'être phosphorylé mais ne lie pas la protéine G, n'est en effet pas non plus capable d'interagir avec les β -arrestines (Bennett et al., 2000). Ce motif DRY des RCPGs, déjà connu comme impliqué dans l'activation de la protéine G, interviendrait donc également dans l'interaction récepteur / β -arrestines.

Les affinités entre membres de la famille arrestine et membres des récepteurs couplés aux protéines G sont diverses. La caractérisation de ces différences a mené à l'établissement d'une classification bipolaire parmi les récepteurs couplés aux protéines G (Oakley et al., 2000) :

- les **récepteurs de classe A**, qui ont une affinité plus forte pour la β -arrestine 2 que pour l'isoforme 1 et faible pour l'arrestine visuelle. Les récepteurs β_2 -adrénergique, μ -opioïde et de la dopamine 1A ont été classés dans cette catégorie (Oakley et al., 2000). Les complexes récepteur / β -arrestine formés sont relativement instables et se dissocient au niveau de la membrane plasmique après de courts temps d'incubation. Ces récepteurs sont rapidement recyclés vers la membrane plasmique.
- les **récepteurs de classe B**, qui lient les deux isoformes de β -arrestine avec de fortes affinités et qui peuvent également interagir avec l'arrestine visuelle. Ils comprennent les récepteurs de l'angiotensine II type 1A ($AT_{1A}R$), de la vasopressine 2, de la substance P (Oakley et al., 2000) et de l'anaphylatoxine C5a (Braun et al., 2003). Les complexes récepteur / β -arrestine formés sont beaucoup plus stables et restent associés durant l'internalisation dans les vésicules d'endocytose. Ces récepteurs sont retenus dans les endosomes pendant de plus longues périodes avant d'être recyclés.

Il ne semble pas exister de lien entre cette classification et les différents types de protéines G couplées aux RCPGs puisque les deux classes de récepteurs comportent des récepteurs couplés à G_s , G_i ou G_q . Les caractéristiques moléculaires déterminant la formation d'un complexe stable entre les récepteurs et les β -arrestines, c'est-à-dire la classification B, ont pu être identifiées. Il s'agit de clusters spécifiques de sérines et thréonines présents au niveau la queue C-terminale des récepteurs, ces clusters sont très conservés dans leur position parmi les récepteurs classés B et absents du domaine C-terminal de la plupart des récepteurs de classe A (Oakley et al., 2001).

III-2 Implication dans l'internalisation des récepteurs

Afin de réguler l'activité des RCPGs, les β -arrestines peuvent non seulement faire cesser la signalisation via les protéines G mais aussi entraîner la désensibilisation de ces récepteurs en participant à leur internalisation. Ce rôle primordial des β -arrestines n'a été mis en évidence par l'équipe du Dr. Marc Caron qu'en 1996, six ans après la découverte de ces protéines (Ferguson et al., 1996). La surexpression de β -arrestines est en effet capable de sauver le phénotype de défaut d'internalisation présenté par des mutants du récepteur β_2 AR non phosphorylables ou tronqués. De plus, l'internalisation du récepteur β_2 AR sauvage est fortement inhibée par l'expression de mutants de β -arrestine (β Arr1 V53D et β Arr2 V54D) (Ferguson et al., 1996). Il a alors été supposé que les β -arrestines étaient des protéines adaptatrices pour des composants classiques de l'internalisation. Depuis, de nombreux récepteurs couplés aux protéines G ont été répertoriés comme impliquant les β -arrestines lors de leur internalisation, qu'il s'agisse classiquement de récepteurs hormonaux, tels que le récepteur β_2 AR (Ferguson et al., 1996) et le récepteur de la FSH (Follicle-Stimulating Hormone) (Piketty et al., 2006), de récepteurs de l'inflammation, comme le C5aR (Braun et al., 2003), ou encore plus récemment de récepteurs olfactifs (Mashukova et al., 2006).

III-2-1 Interaction des β -arrestines avec des composants majeurs de la machinerie d'endocytose

Dans un premier temps, il a été montré que les β -arrestines recombinantes (mais pas l'arrestine visuelle) co-sédimentent *in vitro* avec des cages préformées de **clathrine** et qu'elles colocalisent *in vivo* avec le récepteur β_2 AR activé, la clathrine et le complexe adaptateur AP2 (Goodman et al., 1996).

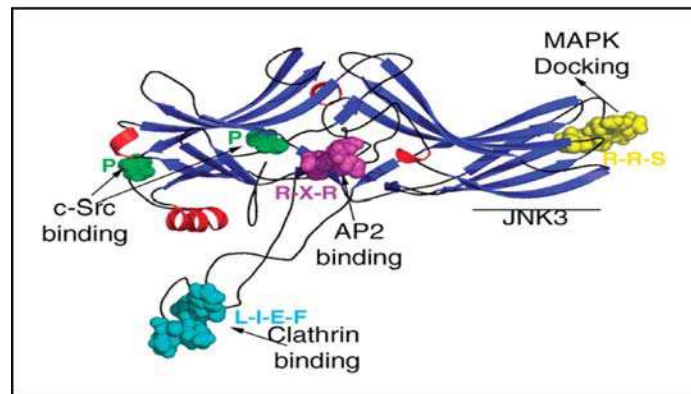


Figure 21 : Structure de la β -arrestine 2 présentant quelques uns de ses sites d'interaction (d'après Lefkowitz et Shenoy, 2005)

La β -arrestine 2 présente des sites de fixation pour AP2 et la clathrine (cf. § précédents), pour la tyrosine kinase c-Src (Luttrell et al., 1999) et pour les MAPK (Miller et al., 2001).

Le site principal d'interaction des β -arrestines avec la clathrine se situe en C-terminal de la protéine (Goodman et al., 1996), il s'agit du motif **LIEF** en position 373-376 de la β -arrestine 2 (LIEL pour la β -arrestine 1) (Krupnick et al., 1997a et Figure 21). Ce motif LIEF comprend des résidus hydrophobes et acides qui interagissent avec les résidus hydrophobes lysines 96 et 98 et avec la glutamine 89 du domaine globulaire de la chaîne lourde de la clathrine (Goodman et al., 1997). Le mutant $\beta\text{Arr}2_{\text{LIEF} \rightarrow \text{AAEA}}$ montre une capacité réduite à interagir avec la clathrine mais pas avec le récepteur. Il en résulte pour le récepteur $\beta_2\text{AR}$, selon les auteurs, soit une inhibition partielle de l'internalisation (Krupnick et al., 1997a), soit une internalisation non modifiée (Laporte et al., 1999). Le fragment 319-418 de la β -arrestine 1 est un dominant négatif de l'internalisation des RCPGs, car celui-ci comprend le site de liaison à la clathrine et se lie donc effectivement à la clathrine mais aucunement au récepteur (Krupnick et al., 1997b). Il a été suggéré que les β -arrestines présenteraient un autre site de liaison à la clathrine que ce domaine LIEF (Orsini et Benovic, 1998), mais cette hypothèse a été infirmée par des analyses en double hybride (Laporte et al., 1999).

Ces mêmes expériences de double hybride en levure ont mis en évidence une autre interaction des β -arrestines avec un autre composant des vésicules mantelées de clathrine : le complexe adaptateur **AP2** et même exclusivement sa sous-unité β , l'adaptine β_2 . Ces conclusions ont été précisées *in vivo* par co-immunoprécipitation de la triade $\beta\text{Arr}/\beta_2\text{AR}$ activé/ β_2 -adaptine avec un maximum après deux minutes d'activation qui témoigne d'un recrutement de AP2 par le complexe déjà formé entre le récepteur activé et les β -arrestines.

Le site d'interaction avec AP2 a été identifié en C-terminal de la β -arrestine 2 et comprend les résidus arginines 394 et 396 (393, 395 pour la β -arrestine 1) (Laporte et al., 2000; Laporte et al., 1999). Le site d'interaction correspondant situé sur la β_2 -adaptine comporte les glutamates 849 et 902, situés en C-terminal de l'adaptine, c'est-à-dire sur l'oreille, un petit corps globulaire relié au corps principal de l'adaptine par une charnière flexible (Laporte et al., 2002 et, pour plus de détails sur la structure de l'adaptine, cf. § D/III-4 des Résultats et Discussions).

Parmi les interactions des β -arrestines avec la machinerie d'endocytose, c'est l'interaction avec AP2 et non avec la clathrine qui est primordiale pour le ciblage initial du complexe β -arrestine / récepteur activé dans les puits mantelés de clathrine préformés (Laporte et al., 2000; Scott et al., 2002a). Par ailleurs, il a également été rapporté que les β -arrestines interagissent avec des protéines non constituantes des puits mantelés de clathrine mais néanmoins nécessaires à l'internalisation. Il s'agit de la protéine G ARF6 (ADP-Ribosylation Factor 6), avec laquelle la β -arrestine 2 interagit suite à la stimulation du récepteur β_2 AR, et sa protéine GEF associée ARNO (ARF Nucleotide binding site Openner), avec laquelle la β -arrestine 2 interagit de façon constitutive (Claing et al., 2001). Ainsi la β -arrestine 2 participe au recrutement au niveau du récepteur activé et à l'activation d'une protéine G nécessaire à l'endocytose.

Un autre type de molécule semble primordial pour l'adressage du complexe β -arrestine / récepteur vers les puits mantelés de clathrine, il s'agit des **phosphoinositides** dont le site de liaison sur la β -arrestine 2 se situe au niveau des lysines 233 et 251 et de l'arginine 237 (conservées dans l'isoforme 1). Outre une inhibition très forte de l'interaction β -arrestines / phosphoinositides, la mutation de ces résidus (KRK→Q) entraîne une absence quasi-totale d'internalisation du récepteur β_2 AR et même d'adressage vers les puits mantelés de clathrine alors que les β -arrestines sont toujours capables de se lier à la clathrine et au récepteur (Gaidarov et al., 1999). Les phosphoinositides constitueraient un point d'attachement multiple des β -arrestines à la membrane plasmique qui favoriserait l'adressage vers les puits mantelés de clathrine.

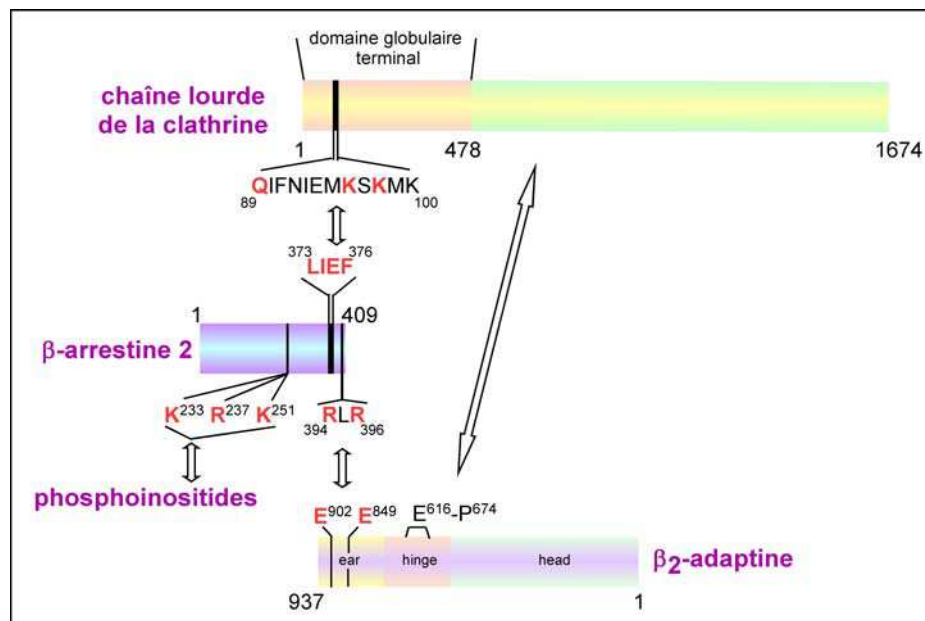


Figure 22 : Schématisation des interactions protéiques impliquant la β -arrestine et des composants de la machinerie d'endocytose

III-2-2 Les β -arrestines participent à l'internalisation d'autres types de récepteurs que les RCPGs

L'idée a émergé en 2003 que les β -arrestines ne participaient pas uniquement à l'internalisation des RCPGs mais également à celle de récepteurs d'autres types. Elles sont par exemple recrutées par un récepteur à sept domaines transmembranaires non couplé aux protéines G, Frizzled 4, un récepteur impliqué dans les processus développementaux qui s'associerait à la β -arrestine 2 par l'intermédiaire de la protéine cytosolique Dishevelled 2 pour induire l'internalisation (Chen et al., 2003b). Les β -arrestines sont par ailleurs impliquées dans l'internalisation de récepteurs des facteurs de croissance à activité tyrosine ou sérine/thréonine kinase à un seul domaine transmembranaire, tels que le récepteur à l'IGF-1 (insulin-like growth factor 1) (Lin et al., 1998) ou le récepteur au TGF- β (transforming growth factor type III) (Chen et al., 2003a). Elles induisent également l'internalisation de molécules d'adhésion comme la néphrine (Quack et al., 2006) ou la VE-cadhérine (Gavard et Gutkind, 2006).

La β -arrestine 1 pourrait également participer indirectement à l'endocytose d'un tout autre type de matériel biologique que les récepteurs, à savoir les bactéries. Il a en effet été récemment montré que la pénétration de la bactérie *Streptococcus pneumoniae* dans les

cellules se ferait par l'intermédiaire de l'endocytose du récepteur PAF et requièrerait la participation de la β -arrestine 1 (Radin et al., 2005). Toutefois, cette étude demande confirmation par d'autres équipes.

Parallèlement à la multitude de récepteurs dont l'endocytose semble dépendre des β -arrestines, il existe certains récepteurs couplés aux protéines G qui internaliseraient indépendamment des β -arrestines. C'est le cas, entre autres, du récepteur metabotropique au glutamate, des récepteurs de la sécrétine, de la sérotonine 5-HT_{2A}, du PAR (Protease-Activated Receptor), du récepteur au leukotriène B4 (pour revue : van Koppen et Jakobs, 2004) et du FPR (cf. § B/II-5-2-2). Les déterminants moléculaires entraînant les récepteurs vers une voie d'endocytose dépendante ou non des β -arrestines sont encore inconnus.

III-3 Implication dans la signalisation, protéines d'échafaudage

La transduction du signal implique des cascades très coordonnées d'événements. La notion d'**échafaudage protéique** ou "scaffold" est apparue dans les années 1990, d'abord chez la levure puis étendue aux autres organismes. Ces échafaudages permettent de contrôler dans le temps et dans l'espace les événements d'activation ou de désactivation de protéines (pour revue : Pawson et Scott, 1997). Il est désormais établi que les β -arrestines participent à de tels échafaudages protéiques, notamment celui responsable de la cascade d'activation des MAP kinases (pour revue : Lefkowitz et Shenoy, 2005).

III-3-1 Implication dans la cascade des MAP kinases

La première preuve de l'implication des β -arrestines dans les voies de signalisation initiées par les RCPGs a été apportée par la découverte que les β -arrestines sont capables de recruter la tyrosine c-Src au niveau de récepteurs stimulés, comme le β_2 AR (Luttrell et al., 1999) ou le récepteur de la substance P (DeFea et al., 2000a). Ce recrutement permet l'activation de c-Src et de la cascade d'activation des MAP kinases. La kinase c-Src n'est pas le seul composant de cette cascade à interagir avec les β -arrestines puisqu'il a pu être démontré que de véritables complexes de signalisation, appelés "**signalosomes**" se forment autour des β -arrestines. L'activation du récepteur PAR2 mène par exemple à la formation d'un complexe contenant le récepteur activé, la β -arrestine 1, la kinase Raf-1 et les kinases ERK1/2 phosphorylées (DeFea et al., 2000b). Une étude similaire a montré que l'activation

du récepteur $AT_{1A}R$ conduit à la construction d'un complexe du même type contenant le récepteur activé, la β -arrestine 2, Raf-1, la MAPK kinase MEK1 et ERK1/2 phosphorylées (Luttrell et al., 2001). Dans les deux cas, il apparaît clairement que les β -arrestines facilitent le déclenchement de la cascade des MAP kinases pour aboutir à l'activation de ERK1/2.

Dans le cas de la stimulation du récepteur $AT_{1A}R$, couplé à une protéine G de type Gq, l'inhibition de l'expression de la β -arrestine 2 par interférence ARN, qui ne laisse persister que la voie dépendante des protéines G, montre clairement que les cinétiques des voies dépendantes des protéines G ou de la β -arrestine 2 ont des profils temporels différents (Ahn et al., 2004a). L'activation de ERK1/2 par la voie des protéines G est rapide et transitoire alors que l'activation par la voie de la β -arrestine 2 est plus lente et plus persistante. Les RCPGs couplés à des protéines G de la famille $G_{q/11}$ induisent une activation de ERK1/2 principalement par un mécanisme dépendant de la PKC. La combinaison simultanée de techniques d'interférence ARN visant la β -arrestine 2 et de blocage de la voie de signalisation vers ERK1/2 dépendante de la protéine G grâce à un traitement avec des inhibiteurs de PKC élimine complètement la phosphorylation de ERK1/2 suite à la stimulation du récepteur $AT_{1A}R$ (Ahn et al., 2004a). Les mêmes observations ont été faites pour le récepteur de l'hormone FSH dont la stimulation mène à deux voies d'activation de ERK, l'une par une protéine de type $G\alpha_s$ et la PKA, et l'autre par les β -arrestines (Kara et al., 2006).

Ainsi, après l'activation de certains RCPGs et de voies de signalisation en aval des protéines G, une deuxième vague de signalisation orchestrée et régulée par les β -arrestines serait enclenchée.

L'une des conséquences fonctionnelles de ces événements est la séquestration des formes phosphorylées de ERK1/2 dans le cytosol au niveau de vésicules d'endocytose. La surexpression des β -arrestines entraîne, dans le cas de la stimulation du récepteur $AT_{1A}R$ par exemple, une diminution de la translocation des formes phosphorylées de ERK dans le noyau. Il en résulte une diminution de l'activité transcriptionnelle du facteur de transcription Elk-1 (Ets domain-containing Transcription Factor 1), qui est dépendante de l'activation de ERK (Tohgo et al., 2002).

Par ailleurs, la β -arrestine 2 peut interagir avec la c-Jun N-terminal kinase 3 (JNK3) et entraîner la formation d'un complexe avec la MAP kinase kinase MKK4 et la kinase ASK1 (Apoptosis Signaling Kinase) (McDonald et al., 2000; Miller et al., 2001). A l'instar de la rétention cytoplasmique de ERK1/2, la kinase JNK3 phosphorylée et activée est exclue du

noyau (Scott et al., 2002b). Un autre partenaire a été impliqué dans ce complexe, il s'agit de la phosphatase MKP7 (MAP Kinase Phosphatase 7) qui interagit de façon dynamique avec la β -arrestine 2. Cette phosphatase se dissocie rapidement de la β -arrestine 2 après activation du récepteur AT₁AR et s'y réassocie plus tard pour déphosphoryler la JNK3 (Willoughby et Collins, 2005).

III-3-2 Implication dans d'autres voies de signalisation

De nombreux autres partenaires protéiques des β -arrestines ont pu être identifiés. Ceci a élargi le rôle des β -arrestines à d'autres voies de signalisation intracellulaires. Les β -arrestines interviennent, par exemple, dans la voie de signalisation PI3K/Akt. Elles participent au cycle de phosphorylation/déphosphorylation de Akt, en rassemblant autour d'elles la protéine Akt et ses régulateurs positif, la PI3K (Povsic et al., 2003), et négatif, la phosphatase PP2A (Protein Phosphatase 2A) (Beaulieu et al., 2005). Ainsi, les β -arrestines participeraient à la protection de la cellule contre l'apoptose, au travers de la régulation de Akt. Ce rôle anti-apoptotique des β -arrestines a été relayé par des observations faites sur des cellules déficientes en β -arrestine. Suite à une stimulation prolongée de certains récepteurs, comme FPR ou AT₁AR (mais pas β_2 AR), ces cellules entrent en apoptose et le phénotype sauvage est restauré par la restitution de l'une ou l'autre isoforme de β -arrestine (Revankar et al., 2004).

La voie NF κ B semble également impliquer les β -arrestines puisque les β -arrestines peuvent interagir avec le facteur d'inhibition I κ B α . Ainsi, le complexe I κ B α -NF κ B serait séquestré dans le cytosol, ce qui atténuerait l'activité transcriptionnelle en réponse à la stimulation des RCPGs (Gao et al., 2004; Witherow et al., 2004).

Les signalosomes formés autour des β -arrestines impliquent donc ces protéines d'échafaudage dans des fonctions cellulaires telles que la prolifération ou l'apoptose. Il a également été rapporté qu'en participant à la compartimentation et/ou à la concentration des signaux, les β -arrestines peuvent concourir à d'autres fonctions cellulaires plus mécaniques, comme le réarrangement du cytosquelette et la formation des pseudopodes lors du chimiotactisme (pour revue : Defea, 2007). Les lymphocytes de souris déficientes en β -arrestine 2 présentent d'ailleurs un défaut de réponse en terme de migration cellulaire dirigée (Fong et al., 2002).

D/ But du travail

Le rôle primordial des cellules phagocytaires dans la défense contre les pathogènes dépend en grande partie de voies de signalisation intracellulaires complexes initiées par un type spécifique de récepteurs couplés aux protéines G, les récepteurs de chimioattractants. Afin d'assurer une réponse cellulaire adaptée et mesurée, les mécanismes mis en jeu doivent être finement régulés. Cette régulation est en partie assurée par des cycles d'activation/désactivation des récepteurs. Après fixation du ligand et transmission du signal par la protéine G hétérotrimérique, les RCPGs sont phosphorylés et interagissent avec les β -arrestines, protéines d'échafaudage qui concourent au processus d'internalisation des récepteurs par la voie des puits mantelés de clathrine. Plusieurs exemples récents suggèrent qu'une signalisation indépendante des protéines G pourrait également être transmise par les β -arrestines et font émerger le concept de macro-complexes de signalisation capables d'assurer la spécificité des réponses cellulaires.

Le but de ce travail a été d'étudier les processus susceptibles de participer à la régulation fine des fonctions cellulaires déclenchées par la stimulation des récepteurs de chimioattractants de la famille FPR et notamment FPRL1. Etant donné l'importance grandissante qu'occupent, dans la littérature récente, les β -arrestines dans la régulation des voies de signalisation initiées par d'autres récepteurs que les récepteurs de chimioattractants, un accent particulier a été mis lors de ce travail de thèse sur le rôle des β -arrestines dans la régulation de l'activité des récepteurs de chimioattractants.

MATERIELS

ET

METHODES

A/ Biologie Cellulaire et Biochimie

I- Lignées et cultures cellulaires

Les cellules **HL-60** sont des cellules promyélocytaires. Les cellules utilisées au laboratoire dérivent d'un clone isolé à partir d'une lignée HL-60 de l'ATCC (American Type Culture Collection).

Les cellules **HEK-293** (Human Embryonic Kidney fibroblast-like) sont des cellules adhérentes issues de tissus rénaux embryonnaires humains. Les lignées utilisées dans ce travail sont des HEK-293 de l'ATCC ou des HEK-293T qui expriment l'antigène T de SV40 et permettent donc d'atteindre des niveaux élevés de surexpression de protéines.

Les cellules **MEF** (Mouse Embryonic Fibroblasts) sont des cellules adhérentes issues d'embryons de souris. Nous disposons au laboratoire de cellules MEF issues de souris sauvages (MEF-WT), ou génétiquement modifiées, à savoir : déficientes en β -arrestine 1 (MEF- β arr1^{-/-}), déficientes en β -arrestine 2 (MEF- β arr2^{-/-}) ou déficientes pour ces deux isoformes (MEF- β arr1^{-/-}&2^{-/-}). Ces quatre lignées ont été mises à notre disposition par le Dr. R.J. Lefkowitz (Duke University Medical Center, Durham, NC ; Kohout et al., 2001).

Toutes les cellules sont cultivées à 37°C sous atmosphère de CO₂ (5 %) en milieu RPMI-1640-glutaMAX1 (Invitrogen) pour les HL-60 ou DMEM-F12 (Invitrogen) pour les HEK et MEF, contenant 100 U/ml de pénicilline, 100 µg/ml de streptomycine et 10 % de sérum fœtal de veau (Clontech), décomplémenté par chauffage pendant 30 min à 56°C. Lorsqu'il s'agit de clones stables de cellules transfectées, la pression de sélection est maintenue par l'ajout d'antibiotiques : le G418, un dérivé de la néomycine, (500 µg/ml, Invitrogen), la blasticidine (10 µg/ml, Invitrogen) ou la puromycine (1µg/ml, Clontech). L'expression conditionnelle dans le système tétracycline est assurée par la doxycycline, un analogue de la tétracycline, (100 ng/ml, Clontech).

La différenciation des cellules HL-60 vers le phénotype neutrophile est induite en traitant les cellules, prises en phase exponentielle de croissance, pendant 3 jours avec 1mM de dibutyl-AMPc (Bt₂AMPc) en absence d'antibiotiques autres que la doxycycline, si cette dernière est nécessaire.

Type cellulaire	Lignées stables établies	origine
HL-60	HL-60-FPR	BBSI, (Dahlgren et al., 2000)
	HL-60-FPRL1	
	HL-60-FPRL2	
	HL-60-tTA (<i>système inductible</i>)	BBSI, (Christophe et al., 2001)
	HL-60-tTA- β -Arr1-EGFP	BBSI, (Rabiet et al., 2002)
	HL-60-tTA- β -Arr1(mut)-EGFP	
	HL-60-FPRL1-TAP	
HEK-293	HEK-293-FPRL1	ce travail
	HEK-293- β Arr1-TAP	
	HEK-293- β Arr2-TAP	
	HEK-293- β Arr2-TAP-FPRL1	
MEF	MEF- β arr1 ^{-/-}	Dr. RJ Lefkowitz, Duke University Medical Center, North Carolina, (Kohout et al., 2001)
	MEF- β arr2 ^{-/-}	
	MEF- β arr1 ^{-/-} &2 ^{-/-}	
	MEF- β arr1 ^{-/-} -FPRL1	ce travail
	MEF- β arr2 ^{-/-} -FPRL1	
	MEF- β arr1 ^{-/-} &2 ^{-/-} -FPRL1	

Tableau 1 : Lignées stables disponibles ou établies durant la thèse

II- Transfection des cellules

II-1 Transfection transitoire

Ce type de transfection n'a été appliqué qu'aux cellules HEK-293, pour lesquelles il permet un haut taux de transfection. Les cellules sont distribuées dans des boîtes de façon à atteindre ~90% de confluence au moment de la transfection, en prenant soin d'utiliser un milieu sans antibiotique. L'ADN et le lipide cationique Lipofectamine[®] 2000 (Invitrogen) sont séparément dilués dans un milieu sans sérum (Opti-MEM, Invitrogen) dans les proportions indiquées par le fournisseur. Après 5 minutes d'incubation, ces deux solutions sont mélangées et laissées à température ambiante pendant 30 min. Le complexe ADN/polymères cationiques est ensuite mis en contact avec les cellules adhérentes pour une période de 48 à 72 h.

II-2 Transfection stable

II-2-1 Cellules myéloïdes HL-60

Les cellules en phase exponentielle de croissance sont diluées à une densité de 2×10^7 cellules/ml en milieu RPMI sans sérum contenant 272 mM de sucrose et 7 mM de Na_2HPO_4 , pH=7,4. Dans une cuve d'électroporation (4 mm de distance interélectrode) sont transférés 500 μl de la suspension cellulaire auxquels sont ajoutés 20 μg d'ADN. Après une incubation de 30 min sur la glace, la cuve d'électroporation est soumise à une impulsion électrique de 250 V pendant 18 à 20 ms (500 μF). Les cellules sont immédiatement récupérées et diluées dans 20 ml de milieu de culture sans antibiotique. Après 48h, elles sont diluées en milieu contenant l'antibiotique de sélection et réparties en plaques 24 puits, de façon à s'assurer d'atteindre une dilution limite où un puits contient au plus une cellule transfectée. Les clones résistants sont obtenus environ 3 semaines plus tard.

II-2-2 Cellules adhérentes HEK-293 ou MEF

Les cellules (5×10^6) sont récoltées et concentrées dans 400 μl de tampon phosphate salin glacé (PBS : 10 mM phosphate de sodium, 138 mM NaCl, 2,7 mM KCl, pH=7,4). Ces cellules sont transférées dans une cuve d'électroporation (4 mm de distance interélectrode) avec 20 μg d'ADN. Après une incubation de 10 minutes, la cuve est soumise à une impulsion électrique de 300 V pendant une dizaine de millisecondes (250 μF). Les cellules sont immédiatement récupérées, diluées dans 50 ml de milieu de culture sans antibiotique et réparties dans 5 boîtes de culture rondes de diamètre 10 cm. Deux jours plus tard, le milieu est échangé pour un milieu contenant les antibiotiques de sélection. Ce milieu est renouvelé 2 fois par semaine. Les clones résistants sont obtenus environ 3 semaines plus tard. Ils peuvent être prélevés de façon individuelle avec l'extrémité d'un cône de pipette contenant de la trypsine (Sigma) et remis en culture dans des boîtes séparées.

III- Analyses menées sur cellules vivantes

Les cellules ont été activées avec des peptides synthétisés par Neosystem (Strasbourg).

III-1 Mobilisation du calcium intracellulaire

Les cellules HL-60 sont incubées en présence de 2 μM de Fura2-AM (ester AcetoMethoxyl de Fura, Molecular Probes) pendant 30 min à 37°C à une densité de 2×10^7 cellules/ml dans du RPMI sans rouge de phénol contenant 0,1 % BSA (Bovine Serum

Albumine). Après lavage, les cellules sont transférées dans une cuvette et activées par ajout de peptide à différentes concentrations. La mesure de la concentration de calcium intracellulaire est réalisée dans un spectrofluorimètre Spex FluoroMAX avec une longueur d'onde d'excitation de 340 nm et une longueur d'onde d'émission de 505 nm. La fluorescence maximale (F_{\max}) est mesurée après ajout de 0,125 % de Triton X-100 et la fluorescence minimale (F_{\min}) après l'addition de 5 mM EGTA et de 30 mM Tris-HCl, pH=7,4. Les concentrations de calcium intracellulaire sont calculées en utilisant la formule suivante : $[Ca^{2+}]_i = K_D \times \frac{(F - F_{\min})}{(F_{\max} - F)}$, déduite de la loi d'action de masse : $Ca^{2+} + \text{Fura2} \leftrightarrow \text{Fura2}/Ca^{2+}$, avec un K_D du calcium pour le Fura-2 de 224 nM.

III-2 Test de chimiotactisme

Les cellules HL-60 non différenciés exprimant de manière stable l'un des récepteurs de chimioattractants, à une densité de 10^6 cellules/ml, sont incubées une nuit avec 10 µg/ml de colorant vital DiI (1,1'-Dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylIndolcarbocyanine perchlorate, Molecular Probes). Les cellules sont alors centrifugées et lavées une fois avec du milieu de culture et deux fois avec du tampon de chimiotactisme (milieu RPMI contenant 1% BSA et 20 mM HEPES, pH=7.5). Les cellules à une densité de 2×10^5 cellules/ml dans 100 µl de tampon de chimiotactisme sont placées dans le compartiment supérieur d'une chambre de chimiotaxie FluoroBlok équipée d'une membrane poreuse (diamètre des pores : 3 µm) (Becton Dickinson). Le peptide à tester est chargé à différentes concentrations dans le compartiment inférieur. La chambre de chimiotactisme est incubée à 37°C pendant 5 heures. Les cellules ayant migré à travers le filtre décantent au fond du compartiment inférieur et sont comptées à l'aide d'un microscope inversé à fluorescence LEICA. Pour chaque expérience, dix champs (en agrandissement de 200 fois) ont été examinés. La migration spontanée a été déterminée en absence de chimioattractant dans le compartiment inférieur.

III-3 Dosage de la production d'ions superoxyde

Les cellules HL-60 différenciées sont lavées et remises en suspension à une densité de 4×10^7 cellules/ml dans du tampon PBS contenant 10 mM glucose, 1 mM Ca^{2+} et 1 mM Mg^{2+} . On ajoute 50 µl de cette suspension cellulaire et le cytochrome c (0,2 mM) à 1 ml de ce milieu préchauffé à 37°C. Si nécessaire, les cellules sont préincubées avec 1 µM de cyclosporine H (Novartis Pharma) 5 min avant l'ajout de cytochrome c. La production d'ions

superoxyde est initiée par addition d'agoniste (par ex. 1 μ M f-MLFK). La réduction du cytochrome c est suivie, dans un spectrophotomètre thermostaté à 37°C, par l'enregistrement continu de l'absorption à 550 nm. Le calcul de la quantité d'ions réducteurs produits est réalisé grâce à la formule $[O_2^-] = \frac{Abs}{(\epsilon \times l)}$ où le coefficient d'extinction molaire ϵ vaut 21,1 $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ et le chemin optique l à travers la cuve est de 1 cm.

III-4 Cytométrie de flux

Les cellules HL-60 sont mises en suspension dans du PBS à une concentration d'environ $0,5 \times 10^6$ cellules/ml. L'analyse est réalisée dans un cytomètre de flux *FACScalibur* (Becton Dickinson). L'intensité de fluorescence émise est mesurée à 488 nm pour chaque cellule. L'exploitation des résultats est faite grâce au logiciel *Cell Quest*.

IV- Techniques utilisant l'immunoreconnaissance par des anticorps

IV-1 Immunofluorescence

Deux protocoles différents de fixation ont été utilisés suivant le type cellulaire.

Les cellules HEK-293 sont cultivées dans des chambres de culture Lab-Tek® 8 puits préalablement recouvertes de polylysine (Sigma) pour obtenir environ 60 % de confluence. Après stimulation ou non, les cellules sont fixées avec un tampon contenant 3 % de paraformaldéhyde (PFA) et 2 % de sucrose puis perméabilisées avec du Nonidet P-40 à 0,1 %. Les cellules sont incubées avec le premier anticorps durant une heure à température ambiante. Le marquage est révélé par une incubation de 30 min à température ambiante avec des anticorps secondaires couplés à des fluorophores de type Alexa-568 (marquage rouge), Alexa-488 ou FITC (marquage vert). Les Lab-Tek® ainsi traitées peuvent être conservées à l'abri de l'obscurité dans du milieu de montage (2,3 % DABCO (1,4-DiAzaBiCyclo[2.2.2]Octane, Sigma), 80 % glycérol, 20 mM Tris, pH=8, 0,2 % azide).

Les cellules MEF sont cultivées sur des disques de verre (diamètre de 12 mm) préalablement recouverts de polylysine pour obtenir environ 60 % de confluence. Après stimulation ou non, les cellules sont fixées et perméabilisées pendant 30 secondes dans un bain d'acétone à -20°C. Les traitements anticorps sont identiques à ceux détaillés ci-dessus.

Les disques de verre sont retournés sur une lame de verre et fixés grâce à du milieu de montage durcissant spécifique pour fluorescence, Vectashield® (Vector Laboratories).

La fluorescence des cellules est examinée avec un microscope inversé Leica à épifluorescence équipé d'une caméra Leica DC 350 F.

ANTICORPS dirigés contre	origine	fournisseur	dilution
actine (<i>I-19</i>)	chèvre	Santa Cruz Biotechnologies	IB : 1 / 1000 ^e
adaptine β_2	souris	BD Biosciences	IB : 1 / 1000 ^e
adaptine β_{3A} (<i>N-15</i>)	chèvre	Santa Cruz Biotechnologies	aucun signal
β-arrestine-1 (<i>K-16</i>)	chèvre	Santa Cruz Biotechnologies	IB : 1 / 500 ^e
β-arrestine-1 et 2 (<i>A1CT</i>)	lapin	Dr. RJ Lefkowitz, (Attramadal et al., 1992)	IB : 1 / 3000 ^e
ERK 2 (<i>C-14</i>)	lapin	Santa Cruz Biotechnologies	IB : 1 / 1000 ^e
phospho-ERK1/2 (<i>E-4</i>)	souris	Santa Cruz Biotechnologies	IB : 1 / 500 ^e
FPRL1 (<i>intracellulaire</i>)	lapin	BBSI, (Bylund et al., 2002)	IB : 1 / 1000 ^e IP : 1 / 150 ^e IF : 1 / 750 ^e
FPRL1 (<i>extracellulaire</i>)	lapin	Affinity BioReagents	IF : 1 / 750 ^e
GFP	lapin	Clontech	IB : 1 / 1000 ^e
lamine B1 (<i>H-90</i>)	lapin	Santa Cruz Biotechnologies	IB : 1 / 750 ^e
Rab11	souris,	BD Biosciences	IF : 1 / 250 ^e
V5	souris	Invitrogen	IB : 1 / 500 ^e IP : 1 / 200 ^e
EEA1 couplé FITC	souris	BD Biosciences	IF : 1 / 250 ^e
LAMP-2 couplé FITC	souris	BD Biosciences	IF : 1 / 250 ^e
IgG souris couplé HRP	mouton	Amersham	IB : 1 / 5000 ^e
IgG lapin couplé HRP	âne	Amersham	IB : 1 / 5000 ^e
IgG chèvre couplé HRP	boeuf	Santa Cruz Biotechnologies	IB : 1 / 6000 ^e
IgG souris, lapin couplé fluorophore	chèvre	Molecular Probes	IF : 1 / 1000 ^e
IgG chèvre couplé fluorophore	âne	Molecular Probes	IF : 1 / 1000 ^e

Tableau 2 : Liste des anticorps utilisés

Les anticorps sont classés en anticorps primaires (simples ou couplés à un fluorophore) et secondaires (couplés à l'enzyme HRP (HorseRadish Peroxidase) ou à un fluorophore). *IB* : immunoblot, *IP* : immunoprécipitation, *IF* : immunofluorescence

IV-2 Immunoprécipitation

Les cellules sont lysées dans un tampon faiblement dénaturant (le plus souvent le tampon TAP décrit en § A/V-2) contenant des inhibiteurs de protéases et de phosphatases (cocktails Sigma). Les anticorps sont préincubés en PBS pendant une heure avec des billes de sépharose recouvertes de Protéine A, puis ce mélange est incubé 2 heures à 4°C avec le lysat cellulaire (préalablement centrifugé 10 minutes à 10 000 g) pour permettre la formation du complexe antigène / anticorps. Les billes sont alors lavées deux fois avec le tampon de lyse et 3 fois en PBS. Un traitement de 10 min à 70 °C avec 50 µl de tampon Laemmli dénaturant réducteur concentré 2 fois (250 mM Tris pH=6.8, 4 % SDS, 20 % glycérol, 10 mM DiThioThreitol (DTT), 0,001 % bleu de bromophénol) permet de récupérer les protéines fixées aux billes.

IV-3 Immunodétection après électrophorèse et électrotransfert (*immunoblot*)

Les protéines contenues dans les échantillons à analyser sont séparées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium (SDS-PAGE). Les protéines sont électro-transférées sur une membrane de nitrocellulose (Schleicher & Schuell) dans un tampon de transfert (25 mM Tris pH=8.5, 192 mM glycine, 0,1 % SDS et 20 % d'éthanol). La membrane est saturée avec du PBS contenant 5 % de lait écrémé (ou 3 % de BSA), puis incubées 2h à 20°C (ou une nuit à 4°C) avec le premier anticorps en PBS-Tween (PBS avec 0,05 % Tween20[®]). Après plusieurs lavages avec du PBS-tween, la membrane est traitée avec l'anticorps secondaire couplé à la peroxydase pour une révélation par chimioluminescence (ECL).

Après séparation des protéines par SDS-PAGE, celles-ci peuvent être révélées par coloration à l'argent selon le protocole décrit ci-après.

Etapes	Tampon	Temps d'incubation
Fixation	EtOH 40%, AcAc 10% EtOH 20%	3 x 30 min 10 min
Lavage	Eau	10 min
Sensibilisation	Na ₂ S ₂ O ₄ 0,3g/l	1 min
Lavage	Eau	2 x 1 min
Traitement argentique	AgNO ₃ 2g/l, formaldéhyde 0,25 ml/l	20 à 60 min
Lavage	Eau	2 x 10 sec.
Révélation	K ₂ CO ₃ 30g/l, fomaldéhyde 0,25 ml/l Na ₂ S ₂ O ₃ 10 mg/l	5 à 10 min
Arrêt	Tris 50g/l, AcAc 20ml/l	30 min
Conservation	Eau	> 30 min

Tableau 3 : Etapes successives de la coloration à l'argent des protéines contenues dans un gel SDS-PAGE

Les tampons sont élaborés à base d'eau milliQ.

V- Préparation d'extraits cellulaires

Après activation à 37°C, et sauf mention contraire, l'ensemble des étapes se fait à 4°C.

V-1 Cinétique d'activation des MAP-kinases ERK1/2

Les cellules HL-60 sont lavées en PBS et mises en suspension à une densité de 5×10^7 cellules/ml dans du milieu PBS contenant 10 mM glucose, 1 mM Ca²⁺ et 1 mM Mg²⁺, elles sont activées à 37°C par ajout de f-MLFK (1µM). Pour chaque point de la cinétique, 200 µl de cellules sont prélevées et lysées pendant 15 min sur la glace en ajoutant 100 µl de tampon de lyse concentré (30 mM Tris, 3 mM EDTA, 450 mM NaCl, 3 % Triton X-100, 0,3 % Na désoxycholate, 0,3 % SDS, 3 mM orthovanadate, 3 mM benzamidine, 30 mM PMSF et 30 µg/mL aprotinine et leupeptine).

Les cellules de type HEK-293 ou MEF sont ensemencées en boîte 6 puits de manière à atteindre ~80 à 90% de confluence le jour de l'essai. Les cellules sont incubées pendant 5 heures dans un milieu RPMI ne contenant qu'1% de sérum, avec ou sans toxine pertussique (100 ng/ml, Sigma) puis 20 minutes dans un milieu totalement dépourvu de sérum. Les cellules sont activées par 100 nM de peptide WKYMVM à 37°C pendant des périodes de temps variant de 30 secondes à 10 minutes, puis placées dans un bain de glace avant d'être lysées dans 70 µl de tampon dénaturant réducteur Laemmli. L'activation des MAPK dans ces échantillons est détectée, après SDS-PAGE, par immunoblot avec des anticorps spécifiques de ERK2 ou des formes phosphorylées de ERK1/2. La quantification des signaux

d'immunodétection est effectuée avec le logiciel ImageJ du NIH. Il a été vérifié pour chaque point de cinétique que la quantité de ERK2 totale était bien équivalente.

V-2 Purification de complexes par affinité en tandem

Les cellules (250×10^6 cellules pour chaque analyse protéomique) sont lavées dans du PBS contenant 1 mM $MgCl_2$ et 1 mM $CaCl_2$ puis récoltées par grattage dans 15 ml de TNEE (50 mM Tris pH 7.6, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA). Après une centrifugation de 3 min à 300 g, le culot de cellules est lysé dans 10 ml de tampon de lyse TAP froid (15 % glycérol, 1 % NP-40, 1 mM EDTA, 150 mM NaCl, 50 mM Tris, pH=8) contenant des inhibiteurs de protéases (cocktail d'inhibiteurs de protéases Sigma) ainsi que des inhibiteurs de phosphatases (cocktail d'inhibiteurs de phosphatases Sigma et 1 mM Na_3VO_4). La lyse s'effectue pendant 30 min sous agitation. Le surnageant est récupéré après 10 min de centrifugation à 10 000 g.

Le lysat est incubé pendant 2 h sous rotation avec 400 μ l de billes d'IgG-agarose (Rabbit IgG-agarose, Sigma) équilibrées au préalable avec du tampon de lyse TAP. Les billes sont lavées avec 30 ml de TBS (10 mM Tris, 138 mM NaCl, 2,7 mM KCl, pH=8) contenant 0,1 % NP-40, puis avec 10 ml de tampon de réaction TEV (Tobacco Etch Virus) (50 mM Tris, pH=8, 0,5 mM EDTA, 1 mM DTT, 0,1% NP-40). Les billes d'IgG sont incubées dans 1 ml de tampon de réaction TEV avec 50 Unités de protéase TEV (Invitrogen) sous agitation à 30°C pendant 30 minutes. Puis 50 Unités de protéase TEV sont de nouveau ajoutés et la mixture est laissée toute une nuit à 4°C sous agitation rotative. L'éluat de 1 ml est récupéré ainsi que deux lavages avec 200 μ l de TBS contenant 0,1 % NP-40. Le tout, mélangé à 4 ml de tampon de liaison à la calmoduline TC (10 mM β -mercaptoéthanol, 10 mM Tris, pH=8, 150 mM NaCl, 1 mM MgAc, 0,1 % NP-40, 1 mM imidazole, 2 mM $CaCl_2$) et aux inhibiteurs de protéases et phosphatases précédemment cités, est incubé une heure avec des billes recouvertes de calmoduline (Calmodulin Affinity Resin, Stratagene), préalablement équilibrées avec du TC de liaison. Le lavage des billes se fait avec 30 ml de TC de liaison et l'élution est réalisée en déposant 5 fois 200 μ l d'un tampon d'élution (TC où les 2 mM de $CaCl_2$ sont remplacés par 4 mM EGTA). L'éluat obtenu (1 ml) est précipité avec 10 % de TCA (Acide TriChloroacétique). Le culot, lavé avec de l'acétone 90% à -20°C, est repris dans 25 μ l de tampon Laemmli.

V-3 Préparation membrane/cytosol

Les cellules adhérentes sont lavées en PBS glacé, grattées dans un tampon sucrose (250 mM sucrose, 10 mM Tris-HCl, pH=7.4, 1 mM EDTA) avec des inhibiteurs de protéases (cocktail Sigma), puis cassées par homogénéisation au Dounce. Les cellules intactes et les noyaux sont écartés par 10 minutes de centrifugation basse vitesse à 1 000 g. Le surnageant est centrifugé 15 minutes à 3 000 g, le culot obtenu contient alors les membranes plasmiques, il est repris dans 20 µL de tampon Laemmli 2X. Après centrifugation 30 minutes à 300 000 g, le surnageant final contient la fraction cytosolique pure.

VI- Manipulations effectuées avec du matériel radioactif

VI-1 Phosphorylation du récepteur après marquage métabolique avec l'acide orthophosphorique [³²P]

Les cellules HEK-293-FPRL1 sont cultivées dans des plaques 6 puits jusqu'à 60 % de confluence. Les cellules sont marquées métaboliquement avec de l'acide orthophosphorique [³²P] (0.3-0.5 mCi/ml) pendant 3 heures à 37°C. La phosphorylation du récepteur est initiée par l'addition de 5 µM de peptide WKYMVM dans du RPMI contenant 10 mM Hepes et 0,1 % BSA. Après 10 minutes à 37°C, les cellules sont lysées avec du tampon RIPA froid (10 mM Tris-Cl, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Triton X-100, 0,5% sodium deoxycholate, 0,1% SDS) contenant des inhibiteurs de protéases (Sigma) et des inhibiteurs de phosphatases (cocktail d'inhibiteurs de phosphatases Sigma et 1 mM Na₃VO₄).

Après centrifugation durant 5 min à 15 000 g à 4°C, les récepteurs phosphorylés, présents dans le surnageant, sont immunoprécipités selon le protocole d'immunoprécipitation classique décrit en § IV-2 avec les anticorps anti-FPRL1 du laboratoire ou selon le protocole de précipitation TAP sur billes d'IgG-agarose décrit en § V-1. Les échantillons sont analysés par SDS-PAGE, le gel est ensuite fixé dans 10 % TCA et 20 % méthanol, séché et exposé à -80°C sur film à rayons X (Fuji XR) pendant 24 heures.

VI-2 Analyse des acides aminés phosphorylés

Le récepteur FPRL1 phosphorylé en présence de ³²P est immunoprécipité comme précédemment décrit. Après séparation par SDS-PAGE et transfert sur membrane Immobilon (Applied Biosystems), la position du récepteur est repérée et le morceau de membrane

correspondant est découpé et traité à l'acide chlorhydrique (200 µl à 6 M) par hydrolyse ménagée à 110 °C pendant 1h30 dans un tube de verre scellé. Le liquide résultant est dilué avec 1 ml d'eau et lyophilisé. Le résidu sec est resolubilisé dans 10 µl de tampon à pH=1,9 (tampon 1 : acide formique/acide acétique/eau ; 22/78/900 (V/V/V)) et déposé sous forme de spot sur une plaque recouverte d'une couche mince de cellulose (10 x 10 cm ; Schleicher & Schüll) ainsi qu'une nanomole de chacun des marqueurs (phosphosérine, phosphothréonine et phosphotyrosine, Pierce) pour l'identification des positions des acides aminés phosphorylés par marquage à la ninhydrine. Les acides aminés phosphorylés sont séparés par électrophorèse bidimensionnelle, d'abord à pH=1,9 (tampon 1) pour 30 minutes à 1000 V, puis à pH=3,5 (tampon 2 : pyridine/acide acétique/eau ; 5/50/945 (V/V/V)) pour 20 min à 1000 V dans une direction perpendiculaire à la première migration. La couche mince est alors doublement révélée : d'abord par coloration à la ninhydrine, puis au PhosphorImager.

VI-3 Iodation du peptide WKYMVm

Le peptide WKYMVm, agoniste de haute affinité de FPRL1, a été marqué avec l'iode ^{125}I par l'utilisation du réactif oxydant en phase solide IODO-GEN[®] (Pierce). Dix nanomoles de IODO-GEN[®] sont solubilisées dans 100 µl de dichlorométhane et utilisées pour recouvrir la surface d'un tube d'iodation en polypropylène par évaporation dans un dessiccateur. Du tampon PBS est ajouté au tube, suivi de 1 mCi de Na^{125}I et de 4 nmol de peptide dilués dans 25 µl de PBS. Le tube est incubé 10 min à température ambiante pour permettre la réaction d'iodation qui est ensuite arrêtée par ajout de 500 µl d'eau. Après 5 min, le mélange est passé à travers une colonne Waters Sep-Pak μC_{18} préalablement lavée avec 10 ml de méthanol et 20 ml d'eau. Après lavage avec 10 ml d'iodure de potassium (5 mM) et 10 ml d'eau, la colonne est retournée et le peptide marqué à l'iode ^{125}I est élué avec 2 ml de méthanol. Le peptide iodé peut être conservé plusieurs semaines à -20°C en méthanol contenant 0,5 % de β -mercaptoéthanol. Une activité spécifique de 100-130 Ci/mmol est habituellement obtenue.

VI-4 Liaison de ligand radioactif

Les cellules adhérentes sont cultivées en boîte 6 puits préalablement traitées à la polylysine (Sigma) pour obtenir ~80-90 % de confluence le jour de l'expérimentation. La liaison du peptide WKYMVm (~100 nM) marqué à l'iode ^{125}I est réalisée à 4°C pendant une heure en milieu RPMI contenant 0,2 % de BSA et 10 mM HEPES. Chaque puits est dupliqué et traité de la même manière avec la présence supplémentaire d'une forte concentration (5µM)

du peptide WKYMVm non marqué pour déplacer le peptide radioactif. Aux temps voulus, les cellules sont lavées trois fois avec du RPMI glacé puis traitées avec 1 ml de soude (NaOH, 2 M). Le liquide visqueux est recueilli dans des types à hémolyse pour compter la radioactivité présente.

VI-5 Séquestration de ligand radioactif

Les cellules adhérentes sont cultivées en boîte 6 puits préalablement traitées à la polylysine pour obtenir ~80-90 % de confluence le jour de l'expérimentation. L'internalisation est initiée par ajout de 1 ml de milieu RPMI à 37°C contenant 0,2% de BSA, 10 mM HEPES et 30 nM de peptide WKYMVm marqué à l'iode ¹²⁵I. Aux temps voulus, les cellules sont lavées une fois avec du RPMI et une fois avec un tampon acide glacé (NaCl 150 mM, acide acétique 200 mM, pH=2.5) avant un traitement de 10 minutes à 4°C avec ce même tampon acide pour éliminer le peptide lié à la surface des cellules. Le résultat est exprimé en pourcentage de peptide radioactif séquestré par rapport au peptide spécifiquement lié selon la

formule = $\frac{\text{cpm résistants au lavage acide}}{\text{cpm "spécifiquement lié" à 4°C}}$, où le "spécifiquement lié" est évalué par essai de

liaison de ligand radioactif (comme précisé au § précédent).

B/ Biologie Moléculaire

I- Méthodologies

I-1 Préparation d'ADN plasmidique

L'ADN plasmidique est isolé en petite quantité à partir des colonies bactériennes selon les protocoles de lyse alcaline classique (Maniatis et al., 1982). Pour les préparations en grande quantité, l'ADN est préparé en utilisant le kit Midi-Prep[®] (Macherey-Nagel). Le principe repose également sur la lyse alcaline des bactéries. Le culot d'ADN final est solubilisé en tampon TE (10 mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH=8,0) et conservé à -20°C.

I-2 Réaction en chaîne par polymérase, PCR

Cette réaction permet l'amplification d'un fragment d'ADN à partir d'une matrice et de deux oligonucléotides choisis de part et d'autre de ce fragment. Le mélange est fait dans un tampon fourni par le fabricant de la polymérase et comprend :

- le plasmide contenant l'ADN à amplifier (50 ng)
- 200 nM de chacun des 2 oligonucléotides (liste présentée en Tableau 5)
- 200 nM de chaque dNTP (désoxy-Nucléotide TriPhosphate, Eurogentec)
- les polymérases Pwo (Roche) ou Pfu (Stratagene).

Le programme se compose de plusieurs phases, dont le cycle est répété entre 20 et 40 fois :

- la dénaturation (1 min à 95°C)
- l'hybridation des oligonucléotides (30 secondes à 1 minute à une température comprise entre 45 et 60 °C suivant la taille et la composition en bases des oligonucléotides)
- l'élongation par la polymérase (à 68°C pour la Pwo ou 72 °C pour la Pfu, la durée dépend de la taille du fragment à amplifier).

L'appareillage utilisé est le Gradient Cyclor PTC-200 de MJ Research.

I-3 Purification des fragments d'ADN

Les fragments d'ADN issus des digestions ou des réactions de PCR sont séparés par électrophorèse sur gel d'agarose (0,8 à 1,5 %) et révélés par le bromure d'éthidium sous UV. Les bandes d'intérêt sont excisées du gel et l'ADN purifié avec le kit Nucleospin[®] (Macherey-Nagel) basé sur la capacité de l'ADN à se fixer sur la silice en conditions chaotropiques. La purification de fragments d'ADN (inférieurs à 1 kb) a également été réalisée sur gel d'acrylamide (5%). L'ADN d'intérêt est extrait de ce gel en tampon TE/NaCl (10 mM Tris, 1 mM EDTA, 1M NaCl), puis précipité par un traitement de quelques heures à -20°C dans 300 mM d'acétate de sodium et 70% d'éthanol.

I-4 Mutagenèse dirigée (Kit QuickChange[®] de Stratagene)

La totalité du plasmide (50 ng) est amplifié par PCR (18 cycles comportant 14 min d'amplification) avec la polymérase Pfu et un couple d'oligonucléotides (~50 nt) s'hybridant sur chaque brin du plasmide de part et d'autre de la mutation. Après cette étape de PCR, le plasmide parental méthylé est détruit par digestion spécifique par l'endonucléase *Dpn* I. L'ADN muté est ensuite utilisé pour transformer *Escherichia coli* (XL1-Blue). Les ADN

plasmidiques des colonies obtenues sur milieu sélectif sont isolés et analysés par séquençage par la société Genome Express.

I-5 Hybridation des oligonucléotides

Les oligonucléotides sens et antisens complémentaires (15 µl chacun) sont mélangés dans un rapport 1:1 à une concentration de 100 µM chacun dans l'eau. Ce mélange est traité thermiquement à 100°C pendant 5 min avant une descente lente en température. Le fragment d'ADN double brin résultant peut être utilisé directement comme insert pour la ligation.

I-6 Ligation et transformation par choc thermique

Le plasmide et l'insert sont incubés pendant 1h à 20°C, dans un rapport molaire de 1/5, avec 1 µl de T4 DNA ligase (Roche) dans 20 µl de tampon de ligation contenant de l'ATP. Les bactéries *E. coli* compétentes (50 µl, JM109) sont transformées par choc thermique avec 5 µl de ce mélange de ligation. Les bactéries sont étalées sur boîte de Petri sur milieu LB-agar contenant l'antibiotique approprié. La boîte est mise dans un incubateur à 37°C pendant 16h.

II- Matériels

Vecteur	origine
pEGFP-N3	Clontech
pEGFP-N3-β-arr1 et 2	BBSI, (Braun et al., 2003)
pEF6-bsd-MycHisA/C	Invitrogen
pEF-neo	Dr. Marie Dinauer, Indiana University School of Medicine, Indianapolis, (Zhen et al., 1993)
pEF-neo-FPRL1	BBSI, (Dahlgren et al., 2000)
pTet-bsd	BBSI, (Rabiet et al., 2002)
pTet-bsd-IRES-EGFP	
pcDNA3.1	Invitrogen
pcDNA3.1-FPRL1 et 2	BBSI, (Christophe et al., 2001)
pZome 1C	CellZome AG
pBluescript SK+	Fermentas

Tableau 4 : Vecteurs des différents vecteurs utilisés

Oligos	sens	Contenu	séquence 5'-xxx-3'	utilisation
FB4R	AS	EcoR I + mutations cluster A sur FPRL1	C CGG AAT TCG TCA CAT TGC CTG TAA CTC AGT CTC TGC AGG AGG TGC AGC AGC ATT GGC AGC CGC GTC ATT AGT TGG GGC TG	mutagenese des sites de phosphoryla- tion de FPRL1
FB9S	S	mutations cluster B sur FPRL1	CC AGT CTG GAG AGG GCC CTG GCT GAG GAC GCA GCC CCA GCT AAT GAC ACG GCT GCC AAT TC	
FB9R	AS	mutations cluster B sur FPRL1	GA ATT GGC AGC CGT GTC ATT AGC TGG GGC TGC GTC CTC AGC CAG GGC CCT CTC CAG ACT GG	
FB10S	S	mutations cluster C sur FPRL1	CGA GAG AGA CTG ATC CAC GCC CTG CCC GCC GCA CTG GAG AGG GCC CTG	
FB10R	AS	mutations cluster C sur FPRL1	CAG GGC CCT CTC CAG TGC GGC GGG CAG GGC GTG GAT CAG TCT CTC TCG	
P91G-S	S	βArr1 (ac. Am. 84 à 98, mut P91G)	GTA CAG TCG TTC CCA CCG GCC GGC GAG GAC AAG CCC CTG ACG CGG	mutagenèse β-arrestine 1 site interaction Src
P91G-AS	AS	βArr1 (ac. Am. 98 à 84, mut P91G)	CCG CGT CAG GGG CTT CTT GTC CTC GGC GGC CGG TGG GAA CGA CTG TAC	
P121E-S	S	βArr1 (ac. Am. 113 à 129, mut P121G)	TAC CCT TTC ACC TTT GAG ATC CCT GAG AAC CTT CCA TGT TCT GTG ACA CTG	
P121E-AS	AS	βArr1 (ac. Am. 129 à 113, mut P121G)	CAG TGT CAC AGA ACA TGG AAG GTT CTC AGG GAT CTC AAA GGT GAA AGG GTA	
TAG-S	S	Sal I + début TAP-TAG (CBP)	ACG CGT CGA CAT GGA AAA GAG AAG ATG GAA AAA G	clonage TAP
TAG-SX	S	Xba I + début TAP-TAG (CBP)	CTA GTC TAG AAT GGA AAA GAG AAG ATG GAA AAA G	
TAG-AS	AS	Not I + fin TAP-TAG (ProtA)	ATA GTT TAG CGG CCG CCT AAT TAG CGT CTA CTT TCG GCG	
TAG-AS2	AS	Not I + après le TAP-TAG (Sal I modifié)	ATA GTT TAG CGG CCG CCA CAG GGT TGA CCA CTG TGC	
EM 5	S	fin β-Arr2 + Sal I + début TAG	G TTC TGC GTC GAC ATG GAA AAG AGA AGA TGG AAA AAG	
EM 7	AS	début TAG + Sal I + fin β-Arr2	CTT TTT CCA TCT TCT CTT TTC CAT GTC GAC GCA GAA CTG GTC ATC ACA GTC	clonage split TAG
EM 2	AS	Xba I + fin FPRL1 sans codon stop	TGC TCT AGA CAT TGC CTG TAA CTC AGT CTC TG	
EM 3	S	Xba I + début espaceur avant TEV-ProtA	TGC TCT AGA GAT TAT GAT ATT CCA ACT ACT GCT AG	
EM 4	AS	Not I + codon STOP + fin CBP	ATA GTT TAG CGG CCG CTC AAA GTG CCC CGG AGG ATG AG	clonage V5 sur AP3β
EM 8	S	Eco NI déjà coupé + épitope V5 à hybrider+ codon STOP + Not I déjà coupé	CT CAG GGG CAG GGT AAG CCT ATC CCT AAC CCT CTC CTC GGT CTC GAT TCT ACG TGA GC	
EM 9	AS	Not I déjà coupé + codon STOP + épitope V5 à hybrider + Eco NI déjà coupé	GGC CGC TCA CGT AGA ATC GAG ACC GAG GAG AGG GTT AGG GAT AGG CTT ACC CTG CCC CTG A	mutagenèse β-arrestine 2 site AP2
EM 11	S	βArr2 de rat (AA 387-402, R394,396A)	C GTG TTT GAG GAC TTT GCG GCG CTT GCG CTG AAG GGG ATG AAG GAT G	
EM 12	AS	βArr2 de rat (AA 402-387, R394,396A)	C ATC CTT CAT CCC CTT CAG CGC AAG CGC CGC AAA GTC CTC AAA CAC G	sequençage
N3-S	S	dans pEGFP-N3 avant le MCS	CCG CTA GCG CTA CCG GAC TCA GAT C	
LB-7'	S	β-arrestine 1, 954 bases après l'ATG	GTT TCC TAC AAA GTG AAA GTG	
pEF-6S	S	fin promoteur EF-1α		
EGFP-AS	AS	dans pEGFP-N3 après l'EGFP	AGG TTC AGG GGG AGG TGT GG	

Tableau 5 : Liste des oligonucléotides utilisés

III- Constructions plasmidiques

Toutes les stratégies basées sur une étape de PCR ont fait l'objet d'un séquençage complet du fragment amplifié par PCR (Genome Express). Dans les autres cas, les constructions ont été contrôlées par des profils de digestion appropriés.

III-1 Vecteurs d'expression de la β -arrestine 1 mutée sur le site polyproline

Les mutations P91G et P121E ont été introduites successivement dans le plasmide pEGFP-N3- β Arr1 par mutagenèse dirigée avec les oligonucléotides P91G-S, P91G-AS, P121E-S et P121E-AS. Le fragment *Bam*HI / *Sal*I de la séquence codant la β -arrestine 1 mutée (β Arr1-mut) a été réintroduit dans le même plasmide n'ayant pas subi la mutagenèse pour obtenir le plasmide final **pEGFP-N3- β Arr1^{P91G-P121E}**, appelé pour simplification **pEGFP-N3- β Arr1(mut)**.

Les plasmides **pTet-bsd- β Arr1-EGFP** ou **pTet-bsd- β Arr1(mut)-EGFP** ont été obtenus par introduction des fragments *Nhe*I / *Not*I des plasmides pEGFP-N3- β Arr1 et pEGFP-N3- β Arr1(mut) dans le plasmide réponse pTet-bsd du système d'expression inducible entre les sites *Xba*I et *Not*I.

III-2 Vecteurs d'expression du récepteur FPRL1 et de ses mutants de phosphorylation

Le plasmide **pEF-bsd-FPRL1** a été obtenu par ligation du fragment *Kpn*I / *Pme*I codant FPRL1 dans pEF6/Myc-HisC.

Pour obtenir les mutants du récepteur FPRL1, la technique classique de mutagenèse dirigée n'a pas pu être mise en œuvre car le nombre de mutations à introduire est trop important (3 acides aminés, donc souvent 6 bases à modifier), et leurs positions trop étalées (jusqu'à une vingtaine de bases) pour espérer une hybridation correcte des oligonucléotides de part et d'autre des sites de mutations. L'aspect financier a été un frein à l'utilisation des kits de mutagenèse dirigée multi-sites qui permettent l'introduction de nombreuses mutations en une seule étape. Une stratégie de mutagenèse par PCR en plusieurs étapes, adaptée de la méthode de Yon & Fried (Yon et Fried, 1989), a été choisie (Figure 23). Pour le clonage dans le vecteur d'expression, il a été également nécessaire d'introduire des sites de restriction enzymatique.

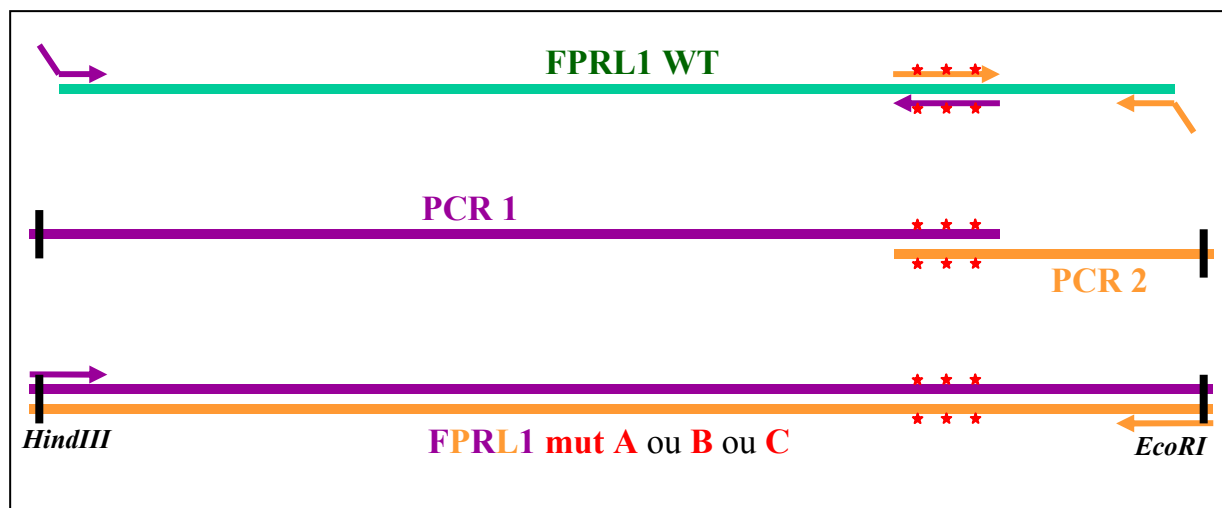


Figure 23 : Stratégie de biologie moléculaire pour l'obtention des mutants de FPRL1

Les oligonucléotides ont permis l'introduction des mutations et des sites de restriction. Le fragment d'ADN codant le mutant A de FPRL1 a été obtenu en une seule étape de PCR car les mutations sont assez près du codon stop de l'ADNc du récepteur FPRL1 pour les insérer dans l'oligonucléotide extrême 3' lors de l'amplification complète de l'ADNc. Pour les mutants B ou C, l'ADN codant FPRL1 a été amplifié en deux fragments séparés : l'un, PCR1, débutant par le site de restriction *HindIII* suivi de la séquence 5' de *FPRL1* et terminant par les mutations désirées, et l'autre, PCR2, débutant par ces mêmes mutations et se terminant par la séquence 3' de l'ADNc du récepteur FPRL1 suivi du site de restriction *EcoRI*. Après purification, les fragments PCR1 et 2 précédemment engendrés ont été hybridés au niveau des sites de mutations et quelques cycles d'élongation par la polymérase ont permis d'obtenir en petite quantité l'ADN double brin correspondant au gène entier et contenant les mutations. Une étape finale de PCR avec les oligonucléotides extrêmes de départ a conduit à l'amplification de l'ADNc entier muté. Enfin, le fragment muté a été inséré dans le vecteur d'expression pcDNA3.1 entre les sites de restriction *HindIII* et *EcoRI*. Un séquençage intégral de l'ADNc muté a été effectué afin de vérifier que les différentes étapes de PCR n'ont pas introduit de mutations autres que celles désirées.

Les différentes combinaisons de clusters mutés ont été obtenues de la même manière en prenant comme matrice de départ l'ADNc déjà muté sur un cluster (ou 2) et en utilisant les oligonucléotides permettant l'introduction des mutations d'un autre cluster. Le mutant AB a par exemple été engendré à partir du mutant A en utilisant les oligonucléotides des mutations du cluster B.

III-3 Vecteurs d'expression basés sur le système TAP

Les vecteurs **pN3-βArr1(ou2)-TAP** et **pEF-neo(ou bsd)-βArr1-TAP** permettent l'expression des β-arrestine 1 humaine ou β-arrestine 2 de rat fusionnées à l'étiquette TAP sous le contrôle du promoteur CMV ou pEF-1α, respectivement.

Le fragment de 560 bases codant le TAP-TAG en entier a été amplifié par PCR à partir du vecteur pZome1C[®], grâce aux oligonucléotides Tag-S et Tag-AS introduisant les sites de restriction *SalI* et *NotI*. Après digestion, le fragment *SalI* / *NotI* a été introduit dans le vecteur pEGFP-N3-βArr1 en remplacement du fragment *SalI* / *NotI* codant l'EGFP pour donner le vecteur **pN3-βArr1-TAP**. La même stratégie appliquée avec les oligonucléotides Tag-S et EM4 a permis la construction du vecteur **pN3-βArr1-CBP**.

La construction du vecteur **pN3-βArr2-TAP** n'a pas pu être réalisée de la même manière que pN3-βArr1-TAP car le vecteur pEGFP-N3-βArr2 dont nous disposons ne présente pas de site *SalI* entre les séquences codant la β-arrestine et l'EGFP. La technique utilisée a été la fusion de gènes par PCR développée par Yon & Fried (Yon et Fried, 1989). Un fragment PCR1 codant la β-arrestine 2 de rat a été amplifié à partir de pEGFP-N3-βArr2, grâce aux oligonucléotides N3-S et EM7. Un fragment PCR2 codant l'étiquette TAP a été amplifié à partir de pZome1C, grâce aux oligonucléotides EM5 et Tag-AS. Les fragments PCR1 et PCR2 se chevauchent à raison de 37 bases correspondant à une partie des oligonucléotides EM7 et EM5. Un dernier fragment PCR3 a pu être amplifié à partir de la matrice composée des fragments PCR1 et PCR2 se chevauchant, grâce aux oligonucléotides extrêmes N3-S et Tag-AS. Ce dernier fragment a été digéré par *SacI* et inséré dans le vecteur pN3-βArr1-TAP coupé par *SacI* en remplacement de la β-arrestine 1 et d'une partie de l'étiquette TAP.

Les mutations R394A et R396A ont été introduites dans le vecteur pN3-βArr2-TAP par fusion de gènes par PCR. Les deux premiers fragments PCR1 et PCR2 ont été amplifiés à partir du plasmide pN3-βArr2-TAP avec les couples d'oligonucléotides N3-S / EM12 et EM11 / EGFP-AS. Les oligonucléotides EM11 et EM12 portent les mutations désirées et sont complémentaires. Une dernière étape de PCR a permis d'amplifier le fragment βArr2^{R394-396A}-TAP à partir du couple d'oligonucléotides N3-S / EGFP-AS et de la matrice composée des fragments PCR1 et PCR2. Après digestion de ce fragment par *PstI* / *NotI*, la séquence codant

une partie de la β -arrestine 2-TAP mutée a été réintroduite dans le plasmide pN3- β Arr2-TAP pour obtenir le plasmide final **pN3- β Arr2^{R394-396A}-TAP**.

Pour obtenir les vecteurs **pEF-neo- β Arr1-TAP** ou **pEF-bsd- β Arr1-TAP**, le fragment *HindIII* (transformé en bout franc par l'enzyme klenow) / *NotI* de pN3- β Arr1-TAP codant la β -arrestine 1 étiquetée TAP a été inséré dans pEF-neo entre les sites *SmaI* et *NotI* ou dans le vecteur commercial pEF6-bsd-MycHisA entre *EcoRV* et *NotI*.

Le vecteur **pEF-bsd- β Arr1-CBP** a été obtenu par clonage du fragment *NheI* / *NotI* du vecteur pN3- β Arr1-CBP codant la β -arrestine 1 étiquetée CBP dans le vecteur pEF6-bsd-MycHisA ouvert par *SpeI* (compatible avec *NheI*) et *NotI*.

Les vecteurs **pEF-neo(ou bsd)- β Arr1-TAP-IRES-EGFP** permettent la transcription d'un ARN messager bicistronique et une expression couplée de la β -arrestine 1 étiquetée et de la protéine fluorescente EGFP. Pour obtenir ces vecteurs, le fragment IRES-EGFP à bouts francs a été excisé du vecteur pTet-bsd-IRES-EGFP par les enzymes *EcoRV* et *NheI* (transformé en bout franc par l'enzyme klenow), puis inséré dans les vecteurs pEF-neo- β Arr1-TAP ou pEF-bsd- β Arr1-TAP ouverts au niveau du site *NotI* (transformé en bout franc par l'enzyme klenow).

Pour obtenir **pEF-neo-FPRL1-Tev-ProtA** :

- le fragment Tev-ProtA, flanqué des sites de restriction *XbaI* et *NotI*, issu d'une PCR menée sur pZome1C avec les oligonucléotides EM3 et TAG-AS,
- et l'ADN codant FPRL1, flanqué du site *XbaI* de part et d'autre du fragment, issu d'une PCR menée sur pEF-neo-FPRL1 avec les oligonucléotides pEF6-S et EM2

ont été clonés séquentiellement et dans cet ordre dans le vecteur commercial pBluescript SK+. Le fragment *EcoRI* / *NotI* codant FPRL1-Tev-ProtA a été extrait de ce vecteur intermédiaire et finalement inséré dans pEF-neo.

Le vecteur **pEF-neo-FPRL1-TAP** permet l'expression, sous contrôle du promoteur pEF, du récepteur FPRL1 fusionné en position C-terminale à l'étiquette TAP. Pour obtenir ce vecteur, les fragments suivants ont été nécessaires :

- le fragment *BstEII/XbaI* de pEF-neo-FPRL1, codant la partie C-terminale de FPRL1
- et le fragment PCR obtenu à partir de pZome1C et les oligonucléotides TAG-SX et TAG-AS2, digéré par *XbaI* et *NotI*.

Ils ont été insérés simultanément, par ligation à 3 fragments, dans pEF-neo-FPRL1-Tev-ProtA délété, par digestion par *BstEII* et *NotI*, de la séquence codant la partie C-terminale de FPRL1 avec l'étiquette Tev-ProtA.

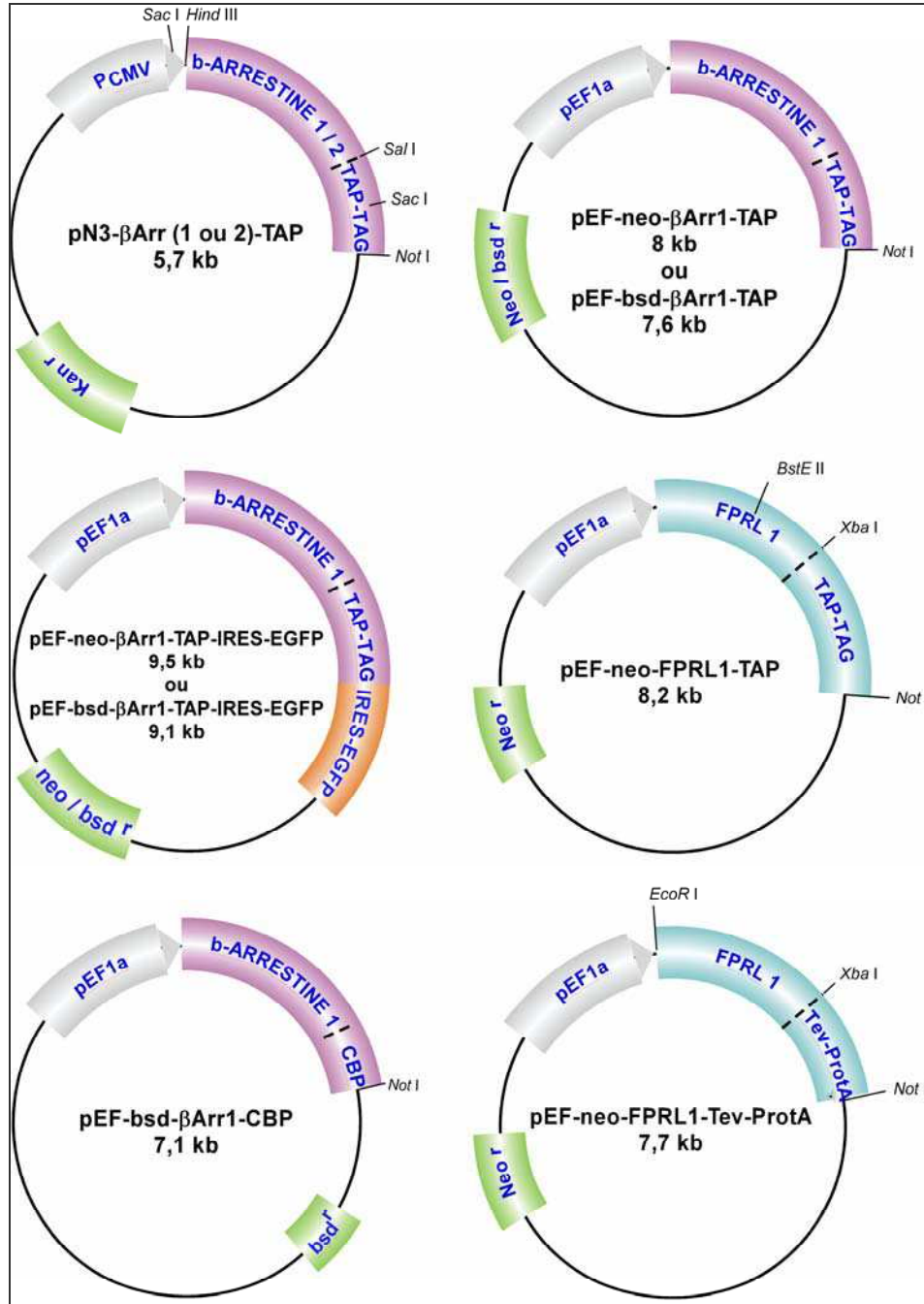


Figure 24 : Schématisation des vecteurs d'expression basés sur la méthode TAP

RESULTATS

&

DISCUSSIONS

Ce travail de thèse s'est particulièrement attaché à l'étude de la **régulation des récepteurs de chimioattractants** de la famille des **récepteurs des peptides N-formylés**. Il est retranscrit ici en quatre volets :

A/ l'**activation** des récepteurs, avec l'**identification de nouveaux agonistes** des récepteurs de la famille FPR

B/ la **signalisation** enclenchée par ces récepteurs, avec un travail centré sur le rôle des **β -arrestines** dans la régulation des voies de **signalisation**

C/ la **régulation** des récepteurs, avec une étude de la **phosphorylation** de FPRL1 et du rôle des **β -arrestines** dans l'**internalisation** de FPRL1

D/ l'utilisation d'une **approche globale** basée sur l'**étude protéomique** pour appréhender les **partenaires des β -arrestines** dans l'ensemble de ces processus.

A/ Identification de nouveaux agonistes des récepteurs de la famille FPR

Les protéines bactériennes et mitochondriales sont les seules sources naturelles de peptides N-formylés. Les récepteurs des peptides N-formylés (récepteurs de la famille FPR, N-Formyl Peptide Receptor) jouent un rôle essentiel dans la réponse inflammatoire et anti-infectieuse. Leur stimulation par les peptides N-formylés provoque la migration des phagocytes vers les sites d'invasion bactérienne ou de dommages tissulaires. Les peptides N-formylés induisent également la production d'ions superoxyde et la libération de peptides anti-microbiens par les phagocytes. De plus, les souris déficientes en FPR font preuve d'une sensibilité accrue aux infections par la bactérie *Listeria monocytogenes* (Gao et al., 1999). L'accumulation de phagocytes sur les lieux de dommages tissulaires pourrait résulter de la lyse des cellules et de la libération de protéines mitochondriales. Il a en effet été montré que des extraits de mitochondries humaines ou des protéines mitochondriales peuvent exercer un effet chimiotactique sur des neutrophiles in vitro (Carp, 1982).

Une collection de 17 peptides N-formylés synthétiques d'origine bactérienne ou mitochondriale a été mise à disposition par le professeur Francis Loor de l'Université Louis Pasteur de Strasbourg. Ces peptides ont été testés pour leur capacité à stimuler les récepteurs de chimioattractants de la famille FPR et à induire des réponses cellulaires (signalisation intracellulaire, chimiotactisme et activation de la NADPH oxydase phagocytaire). Le Tableau 6 présente les séquences de ces peptides, quatre sont dérivés de la bactérie *Listeria monocytogenes* et treize de protéines codées par le génome mitochondrial humain (la NADH déshydrogénase, la cytochrome c oxydase, le cytochrome b et l'ATP synthase).

Type	Séquence	Origine
Peptides dérivés de <i>Listeria monocytogenes</i>	formyl-MIVIL	protéine inconnue
	formyl-MIVTLF	AHM polypeptide
	formyl-MIGWI	protéine membranaire LemA
	formyl-MIGWII	protéine membranaire LemA
Peptides dérivés de protéines mitochondriales humaines	formyl-MPMANL	ND1
	formyl-MNPLAQ	ND2
	formyl-MNFALI	ND3
	formyl-MPLIYM	ND4
	formyl-MLKLIV	ND4
	formyl-MTMHTT	ND5
	formyl-MMYALF	ND6
	formyl-MFADRW	COX I
	formyl-MAHAAQ	COX II
	formyl-MTHQSH	COX III
	formyl-MTPMRK	Cytochrome b
	formyl-MNENLF	ATP synthase sous-unité 6
	formyl-MPQLNT	ATP synthase sous-unité 6

Tableau 6 : Liste des peptides synthétiques testés

NDx : sous-unité x de la NADH déshydrogénase, COX : cytochrome c oxydase

Les récepteurs FPR, FPRL1 et FPRL2 ont été exprimés séparément et de façon stable dans les cellules HL-60 (Christophe et al., 2001; Dahlgren et al., 2000). L'expression est assurée par des plasmides portant les ADNc codant les récepteurs humains sous le contrôle du promoteur du facteur d'élongation humain (pEF1- α), l'un des rares promoteurs efficace dans ce type cellulaire.

Le modèle cellulaire HL-60 est un modèle de choix pour cette étude. En effet, ce sont des cellules de type promyélocytaire qui, bien que n'ayant pas atteint le stade final de différenciation, présentent un certain nombre de caractéristiques des cellules myéloïdes granulocytaires. A l'état non différencié, elles possèdent des protéines G hétérotrimériques susceptibles d'interagir avec les récepteurs de chimioattractants et les composants cytoplasmiques nécessaires à la signalisation intracellulaire conduisant à la mobilisation du calcium et à l'activation des MAP kinases. Toutefois, la surface des cellules non différenciées ne présente pas de récepteurs de chimioattractants. Ces récepteurs doivent être introduits par expression d'un transgène, ce qui confère l'avantage de pouvoir les introduire

individuellement et donc d'en étudier la spécificité. Après différenciation vers un phénotype de type neutrophile, les cellules HL-60 présentent à leur surface des récepteurs chimiotactiques, notamment FPR et FPRL1, et possèdent tous les composants d'une NADPH oxydase fonctionnelle.

I- Identification de nouveaux peptides N-formylés induisant la signalisation intracellulaire par stimulation des récepteurs de la famille FPR

I-1 Mobilisation du calcium intracellulaire

La stimulation des récepteurs de chimioattractants présents à la surface des cellules HL-60 induit l'activation de la phospholipase C (PLC) par l'intermédiaire de la sous-unité $\beta\gamma$ de la protéine G. La PLC hydrolyse le PIP_2 de la membrane plasmique en deux composés essentiels de la signalisation : l'inositol-1,4,5-triphosphate (IP_3) et le diacylglycérol. L'activation du récepteur de l' IP_3 , présent sur des vésicules où le calcium est concentré, aboutit à la libération du calcium dans le cytoplasme. La mesure des variations de la concentration intracellulaire de calcium est donc un bon indicateur de l'activation d'un récepteur de chimioattractants.

Les cellules HL-60 en suspension sont mises en présence d'acetomethoxy-**Fura2**, molécule neutre capable de diffuser dans les cellules et d'y être piégées après désestérification. La sonde fluorescente Fura2 liée au calcium intracellulaire libre émet, sous excitation à 340 nm, une fluorescence à 505 nm. L'intensité de la fluorescence détectée est proportionnelle à la concentration de calcium. La Figure 25 présente la courbe de suivi type obtenu par lecture au spectrofluorimètre lors d'un test de mobilisation du calcium intracellulaire.

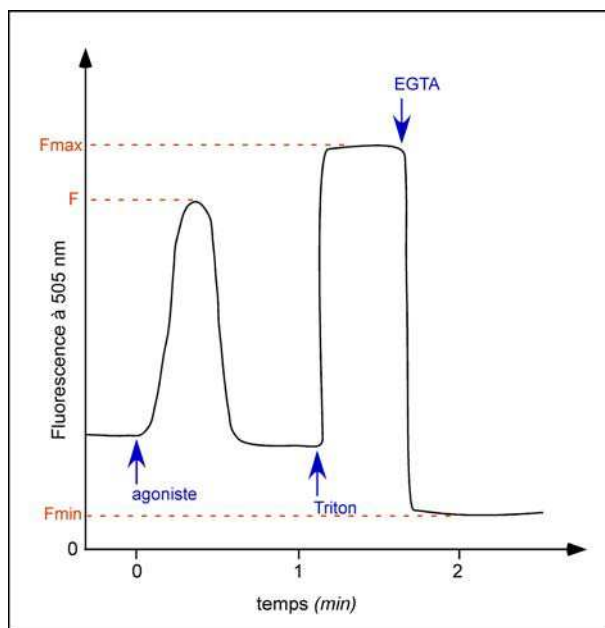


Figure 25 : Suivi de fluorescence type lors d'un test de mobilisation calcique au Fura2

La fluorescence du Fura2 complexé au calcium présent dans la cellule est suivie à 505 nm. L'ajout d'agoniste provoque une augmentation transitoire de la fluorescence culminant à la valeur F . L'ajout de Triton X-100 lyse les cellules et libère le Fura2 dans le milieu extracellulaire où le calcium en excès titre la totalité du Fura2. On mesure alors la fluorescence maximale qui peut être atteinte (F_{\max}). Enfin, l'addition d'EGTA, chélateur du calcium, dissocie le Fura2 du calcium et annihile le signal de fluorescence du complexe Fura2/ Ca^{2+} (F_{\min}). La concentration maximale de calcium libre en réponse à la stimulation par l'agoniste est calculée grâce à la formule suivante :

$$[\text{Ca}^{2+}]_i = K_D \times \frac{(F - F_{\min})}{(F_{\max} - F)} \quad \text{où } K_D = 224 \text{ nM est la constante de dissociation du complexe Fura2/Ca}^{2+}.$$

Ce test a été réalisé en utilisant différentes concentrations de chaque peptide et des cellules exprimant individuellement chacun des récepteurs (HL-60-FPR, HL-60-FPRL1, ou HL60-FPRL2). Ainsi, pour chaque couple récepteur/peptide, on peut apprécier l' EC_{50} , c'est-à-dire la concentration de peptide pour laquelle 50 % de l'effet maximal est obtenu ; plus l' EC_{50} est faible, plus l'agoniste est puissant. L'ensemble des résultats est présenté en Figure 26 sous forme de graphiques représentant les concentrations maximales de calcium libéré pour chaque récepteur en fonction de la concentration des différents agonistes. Les valeurs des EC_{50} correspondantes sont détaillées en Tableau 7.

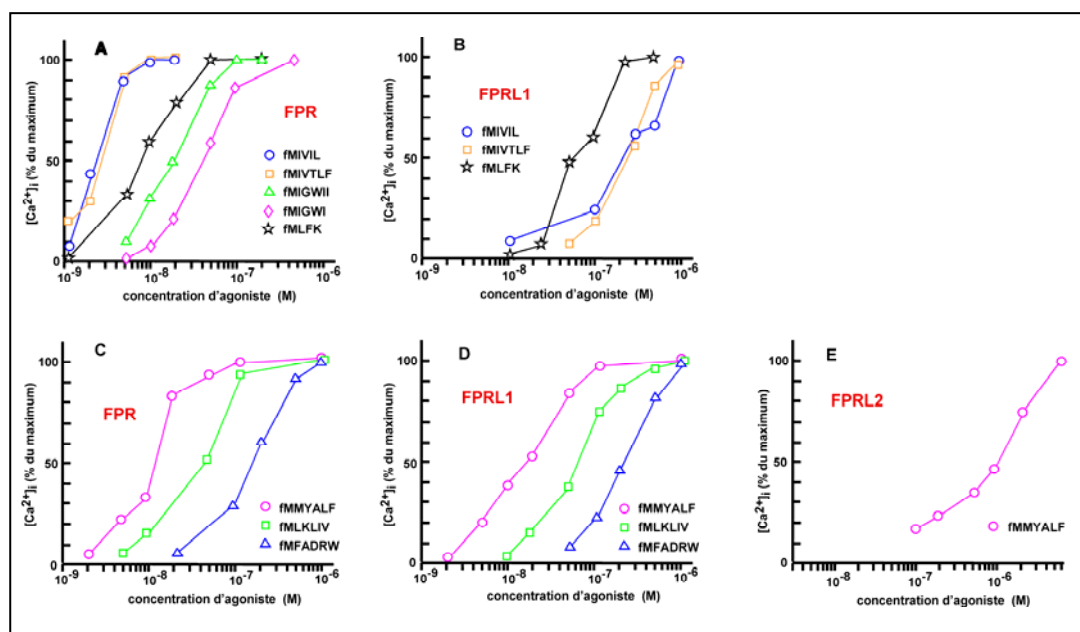


Figure 26 : Courbes dose-réponse de la mobilisation de calcium intracellulaire dans les cellules HL-60 exprimant FPR, FPRL1 ou FPRL2

(A & B) peptides dérivés de *L. monocytogenes*. (C, D & E) peptides dérivés de protéines mitochondriales. Les concentrations maximales de calcium libéré pour chaque récepteur à différentes concentrations d'agonistes sont exprimées en pourcentage de la réponse maximale pour chaque peptide.

Peptide	EC ₅₀ du test de mobilisation du calcium		
	HL-60-FPR	HL-60-FPRL1	HL-60-FPRL2
Peptides dérivés de <i>L. monocytogenes</i>			
f-MIVTLF	2,7 nM	200 nM	inactif
f-MIVIL	2,2 nM	160 nM	inactif
f-MIGWI	20 nM	210 nM	inactif
f-MIGWI	40 nM	inactif	inactif
Peptides mitochondriaux			
f-MMYALF	12 nM	15 nM	1 µM
f-MLKLIV	45 nM	55 nM	inactif
f-MFADRW	160 nM	210 nM	inactif

Tableau 7 : Activités biologiques des peptides (EC₅₀ du test de mobilisation du calcium) dans les cellules exprimant les récepteurs de la famille FPR

L'EC₅₀ du peptide f-MLFK, prototype classique des chimioattractants, est de 8 nM dans le cas de cellules HL-60-FPR et de 30 nM dans le cas de cellules HL-60-FPRL1. Parmi les quatre peptides dérivés de *L. monocytogenes* qui ont été testés, deux ont été identifiés

comme de très bons agonistes du FPR avec des EC_{50} de l'ordre du nanomolaire. Il s'agit des peptides f-MIVIL et f-MIVTLF. Tous les deux sont trois à quatre fois plus actifs (EC_{50} de 2,2 et 2,7 nM respectivement) que le chimioattractant classique f-MLFK. Les deux autres peptides testés, f-MIGWI et f-MIGWIL, sont des agonistes du FPR légèrement moins puissants que le référent f-MLFK. Les peptides f-MIVIL et f-MIVTLF présentent une EC_{50} 70 fois supérieure dans le cas des cellules exprimant le récepteur FPRL1 que dans le cas des cellules exprimant le récepteur FPR. Par ailleurs, aucune mobilisation de calcium intracellulaire n'a pu être détectée suite au traitement des cellules exprimant FPRL2 par ces quatre peptides.

En ce qui concerne les treize peptides mitochondriaux, seuls trois se sont avérés capables d'induire une mobilisation du calcium intracellulaire. Il s'agit des peptides f-MLKLIV, f-MMYALF et f-MFADRW, dérivés respectivement des sous-unités 4 et 6 de la NADH déshydrogénase et de la sous-unité I de la cytochrome c oxydase. Cette série de peptides montre une capacité d'activation décroissante dans l'ordre f-MMYALF > f-MLKLIV > f-MFADRW vis-à-vis des récepteurs FPR et FPRL1 sans toutefois montrer de meilleure affinité pour l'un ou l'autre de ces récepteurs. Seul le peptide f-MMYALF à forte concentration est capable d'induire une mobilisation du calcium intracellulaire par activation de FPRL2.

I-2 Signalisation vers les MAP kinases

La stimulation des cellules myéloïdes par les chimioattractants induit très rapidement (dès les 30 premières secondes) une activation de la voie des MAP kinases (MAPK, Mitogen-Actived Protein Kinase), et notamment la phosphorylation des kinases ERK1/2 (Extracellular signal-Regulated Kinase 1 et 2). L'activation des MAP kinases fait intervenir des voies de signalisation plus complexes que celles impliquées dans la mobilisation du calcium intracellulaire et peut être considérée comme un processus plus distal en aval du récepteur (cf. Introduction, section B/II-4). Il a donc été vérifié que les peptides sélectionnés pour leur capacité à mobiliser le calcium intracellulaire par l'activation des récepteurs de la famille FPR étaient également capables d'induire l'activation des kinases ERK1/2.

Les kinases ERK1/2 sont activées par double phosphorylation sur thréonine et tyrosine. Cette phosphorylation peut être détectée par des anticorps monoclonaux spécifiques de leurs formes phosphorylées. Les cellules HL-60-FPR, HL-60-FPRL1 ou HL-60-FPRL2 ont été

traitées par des concentrations saturantes de peptides pendant 30 secondes. Les lysats cellulaires ont été analysés par Western blot et immunodétection des formes phosphorylées de ERK1/2. Comme le montre la Figure 27, les résultats correspondent qualitativement à ceux des tests de mobilisation du calcium intracellulaire, c'est-à-dire que tous les peptides induisant la mobilisation du calcium après stimulation d'un récepteur de la famille FPR, entraînent la phosphorylation de ERK1/2 via ce même récepteur. Cette activation n'a pas lieu en absence d'agoniste et le niveau de phosphorylation de ERK est similaire à celui engendré par un agoniste classique (f-MLFK pour FPR et WKYMVm pour FPRL1 et FPRL2). Par ailleurs, les peptides n'induisant pas de mobilisation du calcium intracellulaire via FPRL2, n'entraînent pas non plus d'activation de ERK1/2, même à forte concentration de peptide (1 μ M).

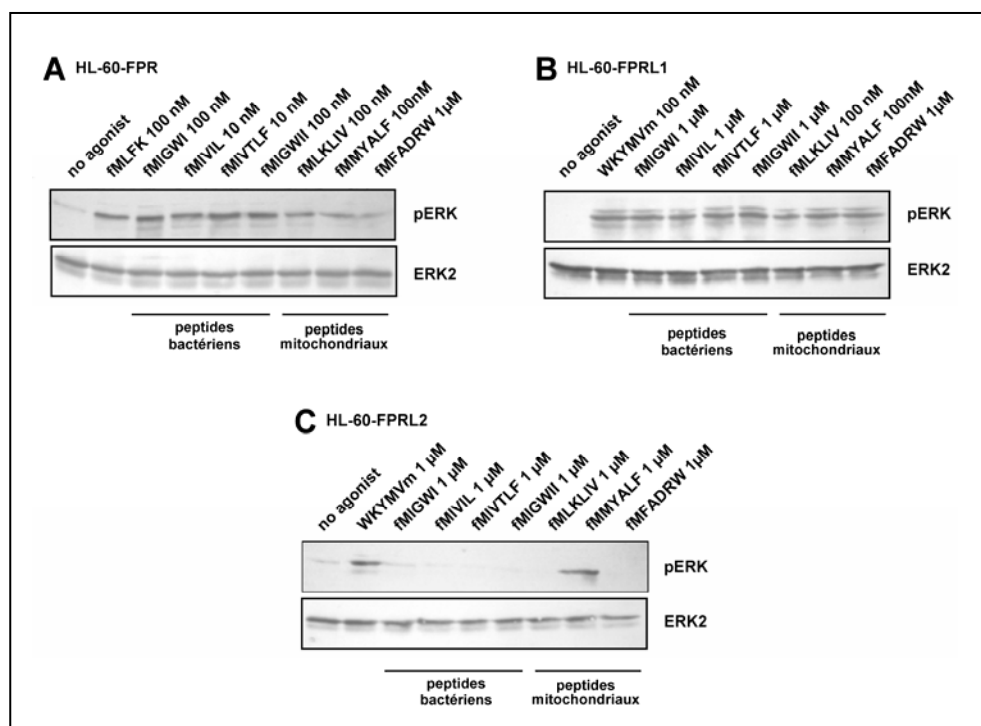


Figure 27 : Activation des MAP kinases dans les cellules HL-60 exprimant FPR, FPRL1 ou FPRL2

La phosphorylation de ERK 1/2 a été révélée par immunodétection des formes phosphorylées de ERK 1/2 sur des lysats de cellules HL-60 exprimant spécifiquement FPR, FPRL1 ou FPRL2 et activées pendant 30 secondes par les différents peptides aux concentrations indiquées. La quantité totale de ERK2 a été contrôlée dans chaque cas avec des anticorps spécifiques de l'isoforme ERK2.

II- Capacité des agonistes nouvellement identifiés à induire des réponses cellulaires telles que le chimiotactisme et la génération d'ions superoxyde

II-1 Capacité du peptide d'origine mitochondriale f-MMYALF à induire le chimiotactisme des cellules HL-60 exprimant FPRL1 ou FPRL2

La première fonction des facteurs chimioattractants est de provoquer la migration dirigée des cellules vers le site infectieux ou inflammatoire. Cette propriété a été évaluée pour le peptide f-MMYALF dérivé de la sous-unité 6 de la NADH déshydrogénase mitochondriale humaine. Ce peptide est le seul peptide capable d'induire une signalisation intracellulaire via les trois récepteurs de la famille FPR, notamment le récepteur FPRL2 pour lequel peu de ligands fonctionnels sont connus. L'expérience consiste à faire migrer des cellules, à travers une membrane, d'un compartiment dépourvu d'agoniste vers un compartiment contenant différentes concentrations d'agoniste (Figure 28).

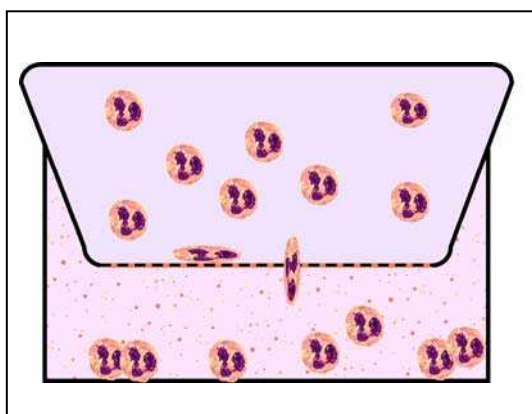


Figure 28 : Chambre de chimiotactisme

Cette chambre comprend deux compartiments : l'un contenant les cellules (*compartiment supérieur*), l'autre la molécule à tester (*compartiment inférieur*). Ces compartiments sont séparés par une membrane poreuse à travers laquelle les cellules peuvent migrer si le composé est chimiotactique.

La Figure 29 est une représentation des résultats obtenus sur des cellules HL-60-FPRL1 ou HL-60-FPRL2 non différenciées, pour différentes concentrations de peptide f-MMYALF allant de 1 nM à 10 μ M. Il apparaît clairement que la quantité de cellules HL-60 exprimant FPRL1 qui migrent dans le compartiment inférieur dépend de la concentration du peptide f-MMYALF. Cette réponse est caractérisée par une courbe en cloche avec un maximum pour 1 μ M de peptide (Figure 29, barres noires). Les cellules exprimant exclusivement FPRL2 répondent également en terme de migration. Toutefois, cette réponse nécessite des concentrations plus importantes de peptide que pour FPRL1 et aucune courbe en cloche n'a pu être obtenue dans la gamme de concentration testée. Cette observation est concordante avec les résultats précédents puisque le peptide f-MMYALF semble être un moins bon agoniste pour FPRL2 que pour FPRL1.

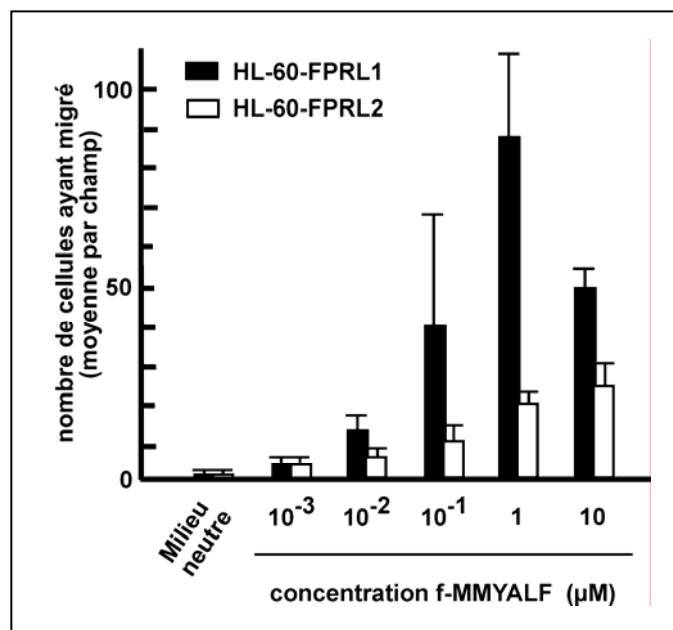


Figure 29 : Activité chimiotactique du peptide mitochondrial f-MMYALF dans les cellules HL-60 non différenciées exprimant FPRL1 ou FPRL2

Moyennes et écarts-types relatifs à 4 expériences.

Le peptide d'origine mitochondriale f-MMYALF présente donc des propriétés chimioattractantes pour les cellules HL-60 qui expriment les récepteurs FPRL1 ou FPRL2. Cette observation assignerait un rôle à ce peptide, et plus généralement aux peptides N-formylés mitochondriaux, dans l'attraction et l'accumulation des cellules leucocytaires au niveau de tissus lésés où une destruction cellulaire et mitochondriale est observée.

II-2 Capacité des agonistes f-MMYALF et f-MIVIL à entraîner la génération d'ions superoxyde par la NADPH oxydase dans les cellules HL-60 différenciées

La finalité physiologique de l'activité leucocytaire est la microbicidie. Elle est réalisée notamment par la libération de molécules toxiques, comme les enzymes lytiques contenues dans les granules ou les ions superoxyde (O_2^-) générés par la NADPH oxydase phagocytaire.

Les cellules HL-60 non différenciées n'expriment pas tous les composants nécessaires à la constitution d'un complexe NADPH oxydase fonctionnel, il est donc indispensable de différencier ces cellules vers un phénotype "neutrophil-like" pour pouvoir mesurer une activité génératrice d'ions superoxyde. Cette différenciation est accompagnée de l'expression constitutive des récepteurs FPR et FPRL1.

Afin de vérifier que les agonistes d'origine microbienne ou mitochondriale nouvellement identifiés induisent les fonctions cellulaires microbicides, les cellules HL-60 différenciées ont été stimulées par différentes concentrations d'un peptide d'origine microbienne, f-MIVIL, ou mitochondriale, f-MMYALF. La génération d'ions réducteurs O_2^- a été suivie indirectement par la réduction du ferricytochrome c en mesurant l'absorption de la lumière à 550 nm, longueur d'onde d'absorption de la forme réduite du cytochrome c.

Les peptides f-MIVIL de *L. monocytogenes* et f-MMYALF dérivé de la NADH déshydrogénase mitochondriale stimulent tous deux la production d'ions superoxyde dans les cellules HL-60 différenciées (Figure 30A et B). La quantité d' O_2^- produite est dépendante de la concentration d'agoniste. Pour le peptide f-MMYALF, l'activité biologique, reflétée par une EC_{50} d'environ 15 nM, est du même ordre de grandeur que celle observée dans le test de mobilisation de calcium. Par contre, dans le cas du peptide microbien f-MIVIL, l' EC_{50} pour la production d'ions superoxyde (~15 nM) est significativement plus haute que celle observée dans le test de mobilisation du calcium intracellulaire (~2 nM). Une différence similaire avait déjà été notée pour le peptide synthétique WKYVMm lors de travaux précédents du groupe (Dahlgren et al., 2000). L'activation de la NADPH oxydase phagocytaire résulte d'un réseau complexe de voies de signalisation qui pourrait être induit moins efficacement par f-MIVIL et WKYVMm que par f-MMYALF.

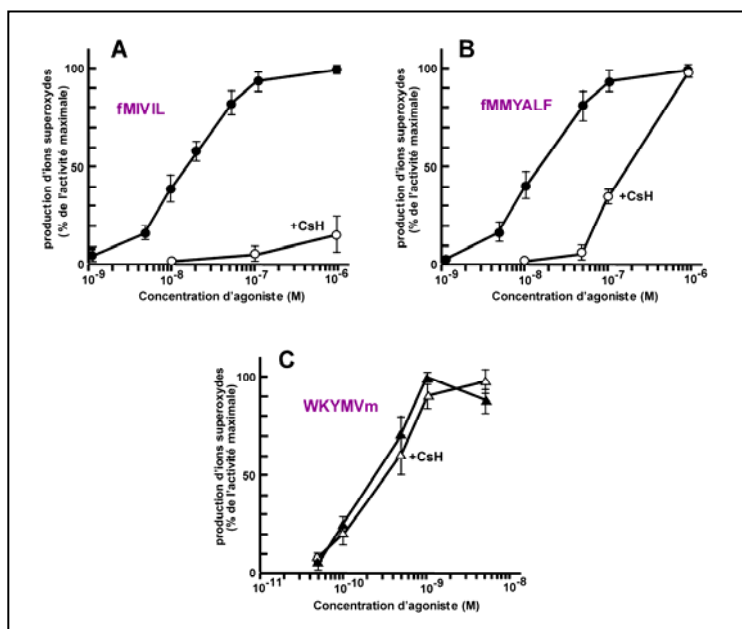


Figure 30 : Activité NADPH oxydase dans des cellules HL-60 différenciées

La production maximale d'ions superoxyde a été mesurée indirectement par la réduction du ferricytochrome c après activation avec différentes concentrations d'agonistes des cellules HL-60 différenciées préalablement incubées ou non avec la cyclosporine H (1 μ M), antagoniste de FPR. Moyennes et écarts-types relatifs à 3 (B,C) ou 4 (A) expériences.

Comme ces expériences sont réalisées en cellules différenciées exprimant de manière constitutive les récepteurs FPR et FPRL1, établir la spécificité des agonistes pour chacun de ces récepteurs devient difficile. Cette difficulté peut toutefois être contournée par l'utilisation d'antagonistes spécifiques connus.

La cyclosporine H (CsH) a été décrite comme antagoniste spécifique du récepteur FPR (Wenzel-Seifert et Seifert, 1993). La cyclosporine H n'a pas d'effet sur l'activité oxydase induite par le peptide WKYMVm, un agoniste qui active les cellules HL-60 différenciées via FPRL1 (Christophe et al., 2001) (Figure 30C). La Figure 30A montre que le traitement des cellules par la cyclosporine H bloque totalement la réponse induite par le peptide microbien f-MIVIL. La production d'ions superoxyde, après stimulation des cellules HL-60 différenciées par ce peptide, est donc entièrement médiée par la stimulation du FPR. Par contre, la cyclosporine H ne bloque la réponse induite par le peptide mitochondrial f-MMYALF que pour les concentrations faibles de peptides (< 100 nM). La réponse oxydase persistante observée pour de fortes concentrations du peptide f-MMYALF correspond très certainement à une action de ce peptide sur FPRL1.

Ces résultats et le fait que, lors des tests de mobilisation du calcium intracellulaire, les peptides dérivés de *L. monocytogenes* aient montré plus d'efficacité sur les cellules HL-60-FPR que sur les cellules HL-60-FPRL1, suggèrent que le récepteur FPR joue un rôle plus important que FPRL1 et FPRL2 dans la défense contre les infections bactériennes. Cette conclusion concorde avec des expériences *in vivo* sur des souris déficientes pour l'orthologue murin du FPR humain qui présentent une susceptibilité accrue aux infections par *L. monocytogenes*, qui n'est pas compensée par la présence des autres récepteurs murins aux peptides N-formylés (Gao et al., 1999).

III- Discussion et conclusions

Les récepteurs de la famille FPR partagent un fort degré d'homologie. Toutefois, des caractères majeurs les différencient et leurs fonctions ne semblent pas être redondantes, comme le laisse percevoir leur spécificité vis-à-vis de certains peptides et leurs différents profils d'expression cellulaire.

Chez la souris, il a été montré que des ligands N-formylés se lient à la molécule H2-M3, molécule présentatrice d'antigène du système MHC classe Ib murin. Ces peptides N-formylés, d'origine bactérienne ou mitochondriale, sont présentés par la molécule H2-M3 aux lymphocytes T cytotoxiques, qui induisent la clairance spécifique lors d'infections primaires et la réponse immunitaire mémoire (Lindahl et al., 1997 ; Pamer et al., 1992).

Le peptide f-MIVIL, identifié dans des surnageants de culture bactérienne de *L. monocytogenes* par spectrométrie de masse en tandem, est, par exemple, présenté aux lymphocytes T par le système H2-M3 (Gulden et al., 1996). Les peptides f-MIGWII et f-MIVTLF sont apparus, dans des études de criblage de bibliothèques génomiques de *L. monocytogenes*, comme des peptides actifs dans la réponse immunitaire murine de type H2-M3 (Lenz et al., 1996; Princiotta et al., 1998). La présente étude a identifié ces trois peptides comme agonistes des récepteurs FPR et FPRL1. De même, le peptide murin correspondant au peptide mitochondrial f-MFADRW, issu de la sous-unité 1 de la cytochrome c oxydase humaine, identifié dans la présente étude comme agoniste de FPR et FPRL1, est un antigène mineur d'histocompatibilité qui se lie à la molécule présentatrice d'antigène H2-M3 et qui est présenté par celle-ci (Morse et al., 1996). Il apparaît donc que les peptides agonistes pour les récepteurs de chimioattractants sont également des antigènes bactériens majeurs dans la réponse immunitaire des souris aux infections.

L'implication dans des fonctions leucocytaires de peptides présentés par le système H2-M3 a également été étudiée. Un peptide N-formylé mitochondrial issu de la sous-unité 1 de la NADH déshydrogénase (ND1) de mitochondries murines et se liant à la molécule H2-M3 a montré des propriétés chimiotactiques pour des neutrophiles de lapin *in vitro* (Shawar et al., 1995). Il a donc été postulé que ce peptide activait les récepteurs des peptides N-formylés présents à la surface des neutrophiles. Dans notre étude, le peptide issu de la ND1 humaine (f-MPMANL), qui n'a aucune homologie avec le peptide murin précédemment cité, n'a présenté aucune activité envers les récepteurs FPR ou FPRL1. Par contre, des peptides issus d'autres sous-unités mitochondriales humaines (f-MLKLIV de la ND4 et f-MMYALF de la ND6), qui ne présentent pas non plus d'homologie avec le peptide chimiotactique de la ND1 murine, entraînent des réponses cellulaires via FPR et FPRL1.

De plus, le peptide f-MMYALF est également capable d'induire une signalisation cellulaire et une réponse chimiotactique dans les cellules HL-60-FPRL2. Ainsi, ce peptide N-formylé d'origine mitochondriale est un agoniste de faible affinité pour le récepteur FPRL2, récepteur considéré jusqu'alors comme réfractaire à l'activation par les peptides N-formylés.

Il existait d'ores et déjà des ligands de FPRL1 qui lient FPRL2 avec une faible affinité. C'est le cas de peptides dérivés de la bactérie *Helicobacter pylori* (Betten et al., 2001) et du facteur neuroprotecteur humain, l'humanine (Ying et al., 2004). De manière intéressante, la forme N-formylée de l'humanine est un meilleur ligand de FPRL1 que sa forme non-formylée, et elle présente des propriétés chimiotactiques pour les cellules CHO exprimant FPRL1 ou FPRL2 (Harada et al., 2004).

Depuis l'identification de la famille des récepteurs aux peptides N-formylés il y a une quinzaine d'années, leur rôle physiopathologique s'est limité à la résistance contre les pathogènes exogènes. Il est désormais démontré que ces récepteurs reconnaissent également des peptides issus de l'hôte même. C'est le cas des peptides mitochondriaux f-MMYALF, f-MLKLIV, et f-MFADRW, identifiés dans cette étude comme agonistes de FPR, FPRL1 (et FPRL2, uniquement pour f-MMYALF). Cette constatation mène à l'hypothèse que les récepteurs de la famille FPR pourraient intervenir dans la régulation des processus inflammatoires associés aux dommages tissulaires, où la destruction des cellules entraîne la libération de protéines mitochondriales.

B/ Rôle des β -arrestines dans les voies de signalisation initiées par les récepteurs de chimioattractants

Les voies de signalisation enclenchées par l'activation des récepteurs de chimioattractants, tels que FPR et FPRL1, aboutissent à des fonctions cellulaires spécifiques telles que la production d'ions superoxyde par la NADPH oxydase. Ces voies font intervenir, entre autres, la tyrosine kinase c-Src et les MAP kinases ERK1/2 (Figure 31). Dans d'autres contextes cellulaires, il a été montré que les β -arrestines peuvent interagir avec c-Src et participer, en tant que protéines d'échafaudage, à son activation ainsi qu'à celle de ERK1/2. Toutefois, un rôle des β -arrestines dans les voies de signalisation spécifiquement initiées par les récepteurs de chimioattractants, et notamment au niveau de l'activation de c-Src ou des MAP kinases, n'a pas encore été démontré.

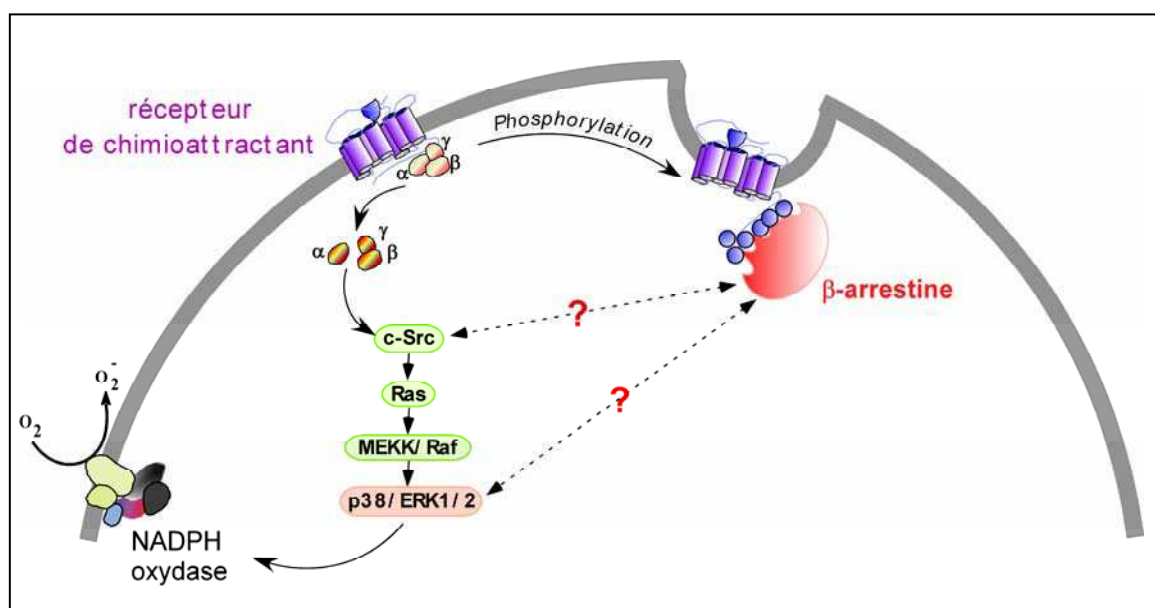


Figure 31 : Schématisation d'une voie de signalisation initiée par les chimioattractants, implication éventuelle des β -arrestines

I- Etude du rôle de l'interaction entre la β -arrestine 1 et la tyrosine kinase c-Src dans les cellules myéloïdes HL-60

L'activation de la NADPH oxydase phagocytaire par les récepteurs de chimioattractants est sensible au pyrazolpyrimidine 1 (PP1), un inhibiteur spécifique des tyrosine kinases de la famille Src (Nijhuis et al., 2002). Les deux isoformes de β -arrestine (β -arrestine 1 et β -arrestine 2) possèdent, au sein d'un domaine polyproline, des motifs PXXP susceptibles d'interagir avec les domaines SH3 (Src Homology domain) de diverses protéines. L'interaction de la β -arrestine 1 avec c-Src implique deux de ces motifs (Luttrell et al., 1999).

A ce jour, il n'a pas été établi si les β -arrestines pouvaient, à travers leur interaction avec les protéines kinase de la famille Src, avoir un rôle dans l'activation de la NADPH oxydase. Pour vérifier une telle hypothèse, l'étude d'un mutant de la β -arrestine 1 incapable d'interagir avec la tyrosine kinase c-Src a été menée.

I-1 Etablissement d'une lignée HL-60 exprimant de façon inductible la β -arrestine 1 sauvage ou mutée sur les motifs impliqués dans son interaction avec la tyrosine kinase c-Src

Les cellules HL-60 différenciées expriment à leur surface des récepteurs de chimioattractants, et répondent aux agonistes en terme de chimiotactisme et de production d'ions superoxyde. Cependant, le rendement de transfection dans ces cellules est faible, ce qui exclut l'expression transitoire. D'autre part, les variations clonales rendent souvent difficile l'interprétation des effets de l'expression de protéines exogènes.

Ces considérations ont conduit à adapter aux cellules HL-60 le système d'expression inductible sous le contrôle de la tétracycline décrit par Gossen et Bujard (Gossen et Bujard, 1992). Des plasmides adaptés pour l'expression dans ces cellules ont été construits (Figure 32) et une lignée HL-60 exprimant de manière stable le transactivateur tTA a été établie (lignée HL-60-tTA) (Rabiet et al., 2002). Ce transactivateur correspond à une protéine de fusion entre le répresseur tétracycline bactérien TetR et le domaine activateur de la transcription de la protéine virale VP16.

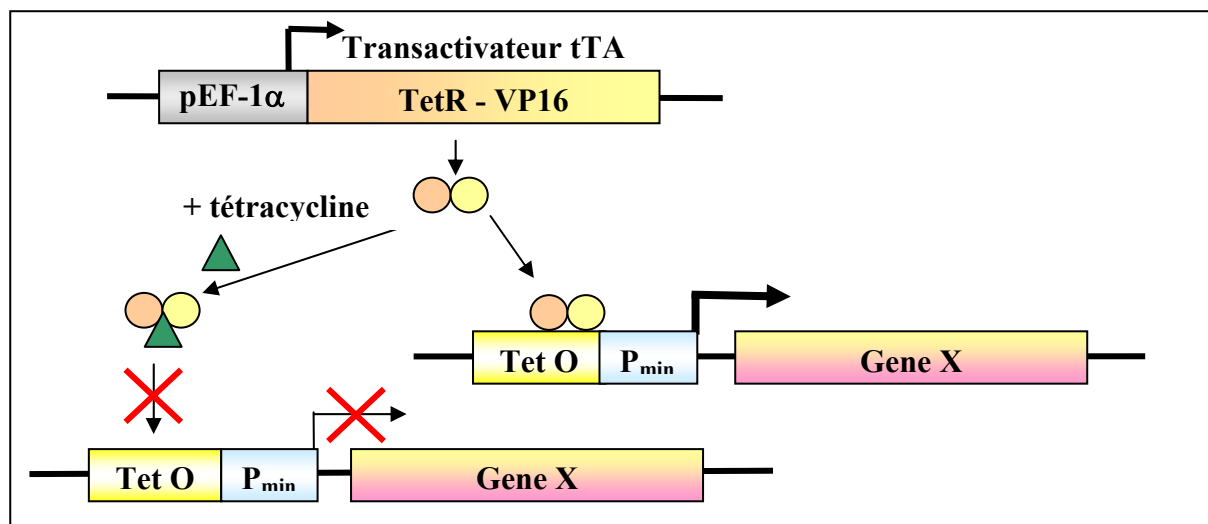


Figure 32 : Système inductible régulé par la tétracycline

Le transactivateur tTA a été placé sous le contrôle du promoteur du facteur d'élongation humain (pEF-1 α) pour promouvoir efficacement l'expression du transactivateur dans les cellules myéloïdes. En absence de tétracycline, ce transactivateur se fixe sur une séquence opératrice (TetO) située, sur un plasmide réponse, en amont d'un promoteur minimum. Cette fixation permet le recrutement de l'ARN polymérase II et, grâce au domaine activateur de la protéine VP16, la transcription du gène X et donc l'expression de la protéine correspondante. En présence de tétracycline, le transactivateur ne peut se fixer sur la séquence TetO et la transcription n'a pas lieu.

Le vecteur pEGFP-N3- β Arr1 permet l'expression, sous le contrôle d'un promoteur fort (P_{CMV}), de la β -arrestine 1 fusionnée à son extrémité C-terminale avec la protéine fluorescente EGFP (Braun et al., 2003). Plusieurs études ont montré que la fusion de la β -arrestine 1 avec l'EGFP n'affecte pas l'interaction avec les RCPGs activés (Barak et al., 1997). Les mutations P91G et P121E, affectant les prolines des deux sites PXXP impliqués dans l'interaction de la β -arrestine 1 avec le domaine SH3 de la tyrosine kinase c-Src (Luttrell et al., 1999), ont été introduites dans le plasmide pEGFP-N3- β Arr1 par mutagenèse dirigée (cf. Matériels et Méthodes). Les plasmides pTet- β Arr1-EGFP et pTet- β Arr1(mut)-EGFP ont été utilisés pour l'expression stable et inductible des protéines de fusion β -arrestine 1-EGFP sauvage ou mutée dans les cellules HL-60-tTA.

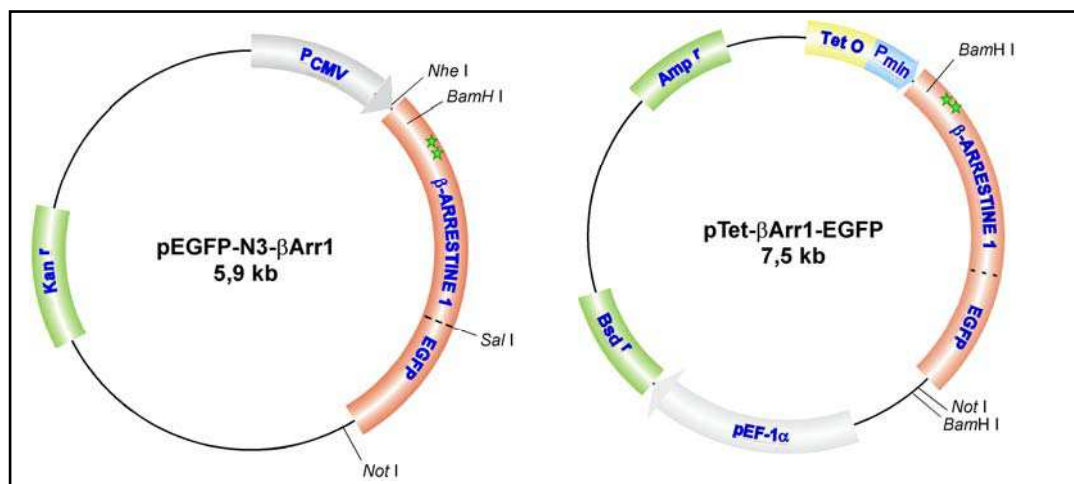


Figure 33 : Plasmides permettant l'expression de la protéine de fusion β -arrestine 1-EGFP

Les étoiles vertes figurent les sites de mutations.

La lignée HL-60-tTA exprimant le transactivateur tTA a été transfectée de manière stable avec les plasmides pTet- β Arr1-EGFP ou pTet- β Arr1(mut)-EGFP. La sélection des clones a été effectuée en présence de blasticidine. La fusion de la protéine d'intérêt à la protéine fluorescente EGFP permet l'analyse des clones par cytométrie de flux. Cette technique a été utilisée non seulement pour sélectionner les clones qui expriment la protéine de fusion parmi ceux résistant à la blasticidine, mais aussi pour vérifier la répression de cette expression en présence de doxycycline, un analogue de la tétracycline.

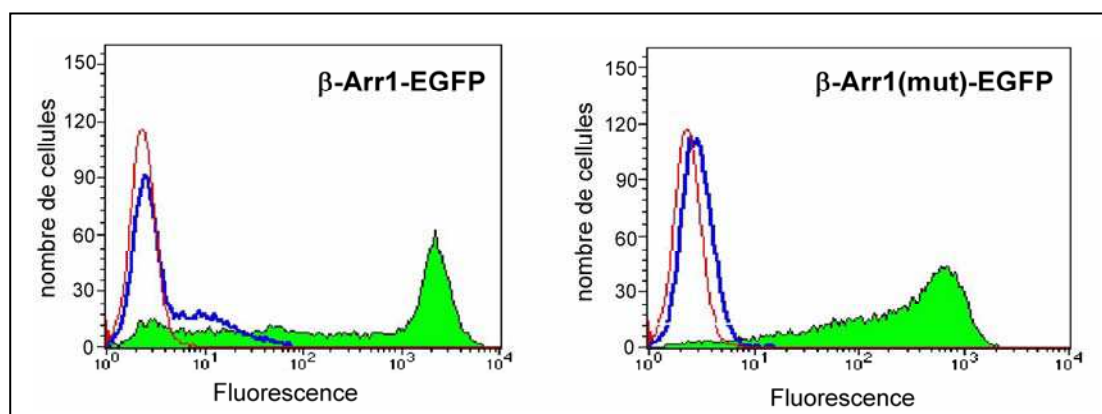


Figure 34 : Analyse de l'expression et de la répression des protéines de fusion par cytométrie de flux

Superposition des profils de fluorescence obtenus pour un clone issu de la transfection avec le plasmide pTet- β Arr1-EGFP (à gauche) ou pTet- β Arr1(mut)-EGFP (à droite), en absence (en vert) ou en présence (en bleu) de doxycycline. Le profil obtenu pour des cellules HL-60-tTA non transfectées apparaît en rouge.

Un clone stable a été retenu pour chaque type de plasmide transfecté. La Figure 34 montre les résultats de cytométrie de flux obtenus pour un clone exprimant la protéine de fusion sauvage (β Arr1-EGFP) et un clone exprimant la protéine de fusion mutée (β Arr1(mut)-EGFP). Le niveau de fluorescence, et donc d'expression, est un peu plus élevé pour le clone sauvage que pour le clone mutant. Les deux clones expriment bien les protéines de fusion de manière inductible, puisque la forte fluorescence des cellules est quasiment réduite à son niveau basal en présence de doxycycline.

I-2 Effet de l'expression du double mutant P91G-P121E de la β -arrestine 1 sur la production d'ions superoxyde

Un effet éventuel de l'expression de la protéine de fusion β -Arr1(mut)-EGFP sur la production d'ions superoxyde a été étudié après différenciation des cellules HL-60 vers le phénotype neutrophile. La production d'ions superoxyde consécutive à la stimulation du récepteur FPR par le peptide N-formyl-Met-Leu-Phe-Lys (f-MLFK), a été déterminée par réduction du cytochrome c.

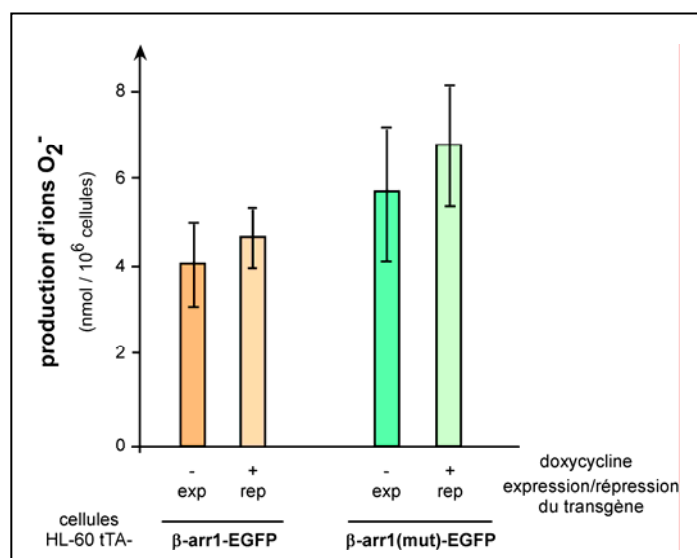


Figure 35 : Analyse de la production d'ions superoxyde dans les cellules HL-60-tTA exprimant ou non la protéine de fusion β -arrestine 1-EGFP ou le mutant

Quantité totale d'ions superoxyde produits après stimulation par ajout de f-MLFK (1 μ M) pour les clones issus de la transfection avec le plasmide pTet- β Arr1-EGFP (barres de gauche) ou pTet- β Arr1(mut)-EGFP (barres de droite), surexprimant (-dox, exp) ou non (+dox, rep) la protéine de fusion correspondante. Moyennes et écarts-type relatifs à 4 expériences.

La production d'ions superoxyde est sensiblement identique dans les cellules issues du clone HL-60-tTA- β -Arr1-EGFP en présence (répression) comme en absence de doxycycline (expression). Dans ce clone, la surexpression de la protéine de fusion β -arrestine 1-EGFP n'a donc pas d'effet significatif sur la production d'ions superoxyde. La même observation a été faite pour les cellules issues du clone HL-60-tTA- β -Arr1(mut)-EGFP. La surexpression du dominant négatif β -arrestine 1(mut)-EGFP n'induit pas de changement significatif sur l'activation de la NADPH oxydase induite par le f-MLFK. Des conclusions équivalentes ont pu être tirées du calcul des vitesses initiales de production des ions superoxyde dans ces mêmes expériences (résultats non montrés).

En présence de doxycycline, les clones HL-60-tTA- β -Arr1-EGFP et HL-60-tTA- β -Arr1(mut)-EGFP montrent un différentiel dans la quantité d'ions superoxyde produits. Toutefois, ce différentiel est indépendant de l'expression des transgènes puisque, dans cette condition expérimentale, il y a répression. Cette différence reflète très vraisemblablement une variation clonale et souligne l'importance de travailler en système inductible où l'expression du transgène peut être induite ou réprimée dans le même clone.

Le fait qu'aucun effet sur la production d'ions superoxyde n'ait été observé lorsque le mutant β -arrestine 1 (P91G-P121E) est exprimé dans les cellules, suggère que, dans le cas de la stimulation des récepteurs de chimioattractants, la voie d'activation des tyrosine kinases de type Src dépendante de la β -arrestine 1, si elle existe, est marginale. Il existe en effet d'autres voies prépondérantes, initiées indépendamment de l'interaction β -arrestine 1 / Src. Des expériences de cotransfection dans les cellules COS-7 suggèrent, en effet, que l'activation de la PI3K γ par le complexe $\beta\gamma$ de la protéine G induit le recrutement de c-Src à la membrane et entraîne l'activation de la voie de signalisation Ras-MAPK (Lopez-Ilasaca et al., 1997; Ma et al., 2000).

II- Etude du rôle des β -arrestines dans la signalisation vers les MAP kinases suite à la stimulation du récepteur FPRL1

Dans le cadre de la stimulation de certains RCPGs, comme le récepteur AT_{1A}R, il est clairement établi que les β -arrestines participent au recrutement et à l'activation de MAP kinases (Luttrell et al., 2001; McDonald et al., 2000). Les MAP kinases ERK1/2 sont phosphorylées en réponse à la stimulation du récepteur FPRL1 par divers agonistes, dont l'hexapeptide WKYMVM (Bae et al., 2003; Christophe et al., 2002). L'implication des β -arrestines dans ce processus n'a pas encore été déterminée. L'influence des β -arrestines sur l'activation des MAP kinases résultant de la stimulation de FPRL1 a donc été examinée, ceci par différentes approches et dans différents types cellulaires. Ce travail fait l'objet d'un article accepté pour publication dans le journal *Cellular Signalling* (cf. annexe E).

II-1 Effet de la surexpression des β -arrestines

Si, en réponse à la stimulation de FPRL1, les β -arrestines servent d'échafaudage facilitant l'activation de ERK1/2, la surexpression des β -arrestines devrait conduire à une augmentation de la phosphorylation des MAP kinases. La phosphorylation de ERK1/2 a donc été examinée en présence ou absence de surexpression des β -arrestines.

Une lignée HEK-293 exprimant de manière stable le récepteur FPRL1 a été établie par transfection avec le vecteur pEF-neo-FPRL1. Les cellules HEK-293-FPRL1 ont ensuite été transfectées de manière transitoire avec des plasmides permettant l'expression de la β -arrestine 1 ou de la β -arrestine 2. Le niveau de surexpression des β -arrestines a été vérifié dans les lysats cellulaires totaux par immunodétection. Comme le montre l'encart de la Figure 36B, les transgènes de β -arrestine sont très fortement exprimés en comparaison avec les β -arrestines endogènes qui sont à peine détectables dans les cellules transfectées avec un vecteur vide. Les cellules ont été stimulées par le peptide WKYMVM. La cinétique d'activation de ERK1/2 a été suivie par immunodétection des formes phosphorylées de ERK1/2 après séparation des protéines contenues dans les lysats cellulaires par SDS-PAGE (Figure 36A). La quantification du taux relatif de phosphorylation de la MAP kinase ERK2, réalisée avec le logiciel ImageJ (NIH), est présentée en Figure 36B.

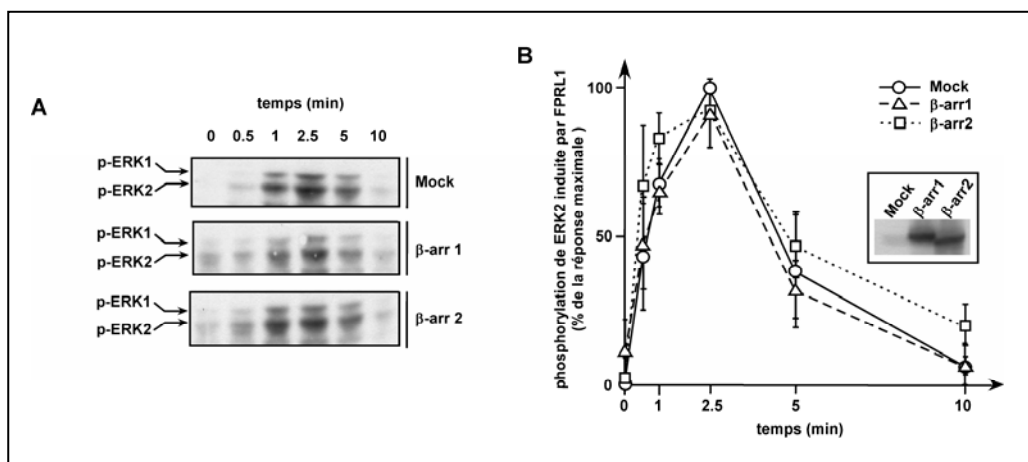


Figure 36 : Cinétique d'activation des MAP kinases dans les cellules HEK-293-FPRL1 surexprimant ou non les β -arrestines

Les cellules HEK-293-FPRL1 surexprimant (β -arr1 ou β -arr2) ou non (Mock) de manière transitoire les β -arrestines ont été stimulées par le peptide WKYMVM (100 nM). (A) immunodétection des formes phosphorylées de ERK1/2, (B) quantification de la cinétique de phosphorylation de ERK2 grâce au logiciel ImageJ, moyennes et écarts types relatifs à 3 expériences, (B, encart) immunodétection des β -arrestines dans les lysats cellulaires totaux avec les anticorps A1CT.

Dans les cellules transfectées avec un vecteur vide (Mock), la stimulation de FPRL1 entraîne une activation transitoire de ERK2. La phosphorylation de ERK2 augmente rapidement. Elle atteint un niveau maximal après 2,5 minutes de traitement par l'agoniste et redescend à un niveau quasiment basal après 10 minutes. Ni la cinétique de phosphorylation de ERK2 induite par la stimulation du récepteur FPRL1, ni le niveau de phosphorylation de ces kinases n'est significativement modifié par la surexpression de l'une ou l'autre isoforme de β -arrestine. Des résultats similaires ont été obtenus lors de la surexpression concomitante des deux isoformes (résultats non montrés).

L'absence d'effet de la surexpression des β -arrestines sur l'activation des MAP kinases ERK1/2 pourrait être le résultat de deux effets opposés. Le recrutement des MAP kinases au niveau du complexe récepteur activé / β -arrestine et donc l'activation de la cascade ERK dépendante des β -arrestines pourraient être renforcés. Simultanément, la surexpression des β -arrestines pourrait accélérer le découplage du récepteur et de sa protéine G, et entraîner une diminution de l'activation de ERK1/2 par la voie des protéines G. Un éventuel effet de la surexpression des β -arrestines sur l'activation de ERK1/2 serait alors masqué.

II-2 Effet de l'absence des β -arrestines

II-2-1 Inhibition de l'expression des β -arrestines par interférence ARN

Des études menées par interférence ARN ont montré que la β -arrestine 2 induit une activation de ERK1/2 indépendamment des protéines G lors de la stimulation du récepteur AT_{1A}R (Ahn et al., 2004b). Une étude similaire utilisant la technique d'interférence ARN a été menée dans le cadre de l'activation des MAP kinases ERK1/2 induite par la stimulation de FPRL1. Des siRNA (petits ARN interférents) double-brins synthétiques de 21 nucléotides ont été utilisés. Ils correspondent aux positions 439-459 ou 201-221 des β -arrestines 1 et 2 respectivement. Il a été montré que l'utilisation de ces siRNA réduit l'expression de chacune des β -arrestines dans les cellules HEK-293 avec une spécificité significative quant à l'isoforme affectée (Ahn et al., 2003).

Toutefois, lors de nos expériences, l'expression de chaque isoforme de β -arrestine n'a pu être réduite que de 40 % et ceci de façon peu spécifique entre chacune des isoformes. L'augmentation de la concentration des siRNA et la modification des conditions de transfection n'ont pas amélioré le pourcentage d'inhibition de l'expression des β -arrestines. La cinétique d'activation de ERK1/2 a tout de même été suivie par immunodétection des formes phosphorylées de ERK1/2 sur les lysats de cellules HEK-293-FPRL1 traitées par interférence ARN et stimulées par le peptide WKYMVM. De façon non surprenante, aucun effet de la transfection des siRNA n'a pu être constaté (Figure 37).

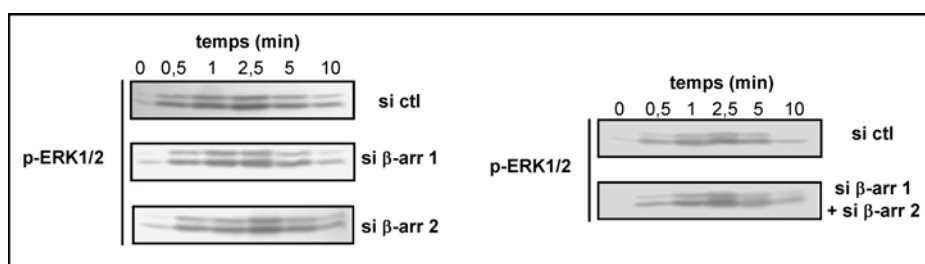


Figure 37 : Effet de petits ARN interférents ciblant les β -arrestines sur la cinétique d'activation des MAP kinases dans les cellules HEK-293-FPRL1

Les cellules HEK-293-FPRL1 transfectées avec des siRNA spécifiques des β -arrestines ont été stimulées avec le peptide WKYMVM (100 nM) pendant la durée indiquée et la phosphorylation de ERK1/2 a été révélée par immunodétection. *Immunoblots représentatifs de 3 expériences.*

A cette même fin, un système moléculaire permettant la production de petits ARN interférents a été mis au point au cours de ce travail et validé pour la cible β -arrestine 1 (cf.

annexe A), mais pas pour la β -arrestine 2 et cet outil n'a donc pas pu être utilisé pour l'inhibition de l'expression des deux isoformes de β -arrestine.

II-2-2 Absence d'expression des β -arrestines

Afin de déterminer si les β -arrestines jouent un rôle dans l'activation des MAP kinases ERK1/2 suite à la stimulation du récepteur FPRL1, des lignées MEF (Mouse Embryonic Fibroblast) déficientes en β -arrestine ont été utilisées (Kohout et al., 2001, groupe du Dr. RJ Lefkowitz). Le récepteur FPRL1 a été exprimé de façon stable dans des cellules MEF issues de souris sauvages (MEF-FPRL1) ou dans des cellules MEF déficientes pour les deux isoformes de β -arrestine (MEF- β arr1&2^{-/-}-FPRL1).

Pour chacune des lignées, la présence ou l'absence des β -arrestines dans les lysats cellulaires totaux a été vérifiée par Western blot (Figure 38A). Pour comparer les capacités de ces deux lignées en terme de signalisation, l'expression du récepteur FPRL1 a été évaluée par des expériences de liaison du ligand WKYMVm marqué avec l'iode ¹²⁵I (cf. Matériels et Méthodes, § A/VI-4). Comme le montre la Figure 38B, des niveaux d'expression de récepteur en surface du même ordre de grandeur ont été mesurés pour les lignées MEF-FPRL1 et MEF- β arr1&2^{-/-}-FPRL1.

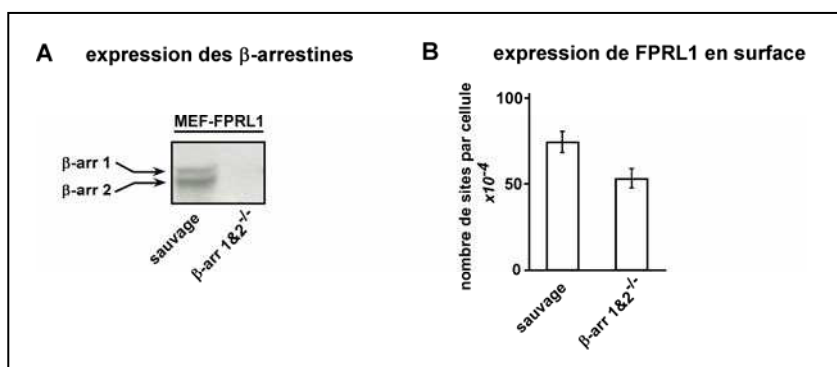


Figure 38 : Caractérisation des lignées MEF-FPRL1 et MEF- β arr1&2^{-/-}-FPRL1

(A) Immunodétection des β -arrestines dans les lysats cellulaires totaux. (B) Evaluation du nombre de récepteurs FPRL1 en surface capables de lier le peptide WKYMVm marqué avec l'iode ¹²⁵I. Moyennes et écarts-types relatifs à 3 expériences.

La cinétique de phosphorylation de ERK1/2 suite à la stimulation du récepteur par le peptide WKYMVm a été examinée dans ces deux lignées, comme précédemment par Western blot. La Figure 39 montre, pour chaque lignée, une immunodétection des formes phosphorylées de ERK et une courbe représentant la cinétique de cette phosphorylation.

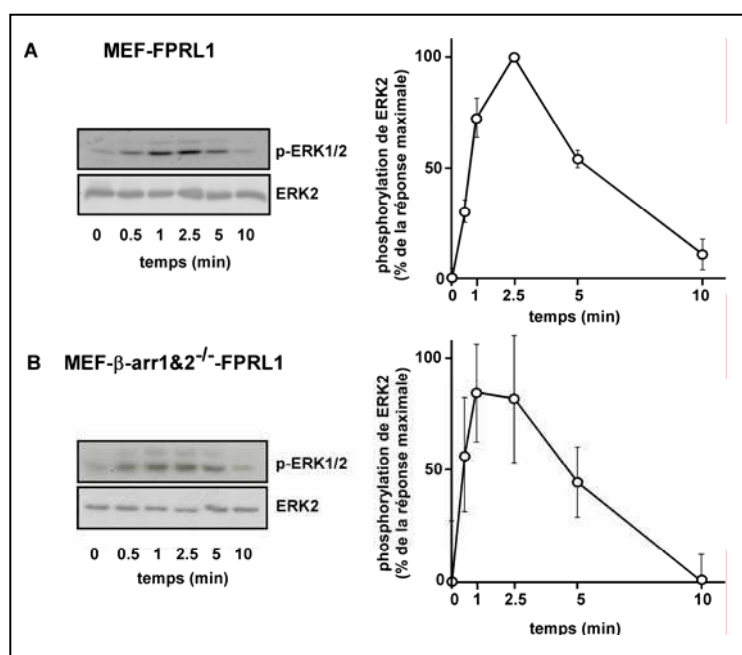


Figure 39 : Cinétique d'activation des MAP kinases dans les cellules MEF-FPRL1 déficientes ou non en β -arrestine

Les cellules MEF-FPRL1 de type sauvage (A) ou déficientes en β -arrestine (B) ont été stimulées avec le peptide WKYMVM (100 nM). La cinétique de phosphorylation de ERK1/2 a été révélée par immunodétection, puis les signaux correspondants ont été quantifiés avec le logiciel ImageJ. Moyennes et écarts-types relatifs à 5 expériences.

Dans les cellules MEF-FPRL1 servant de contrôle, la stimulation du récepteur par l'hexapeptide entraîne une phosphorylation rapide et transitoire de ERK2, avec un maximum à 2,5 minutes et une cinétique de retour à un niveau basal semblable à celle observée dans les cellules HEK-293-FPRL1 (Figure 39A et Figure 36B). Le profil de phosphorylation de ERK2 est similaire dans les cellules déficientes en β -arrestine 1 et 2 (Figure 39B). Ces résultats suggèrent que les β -arrestines ne jouent pas de rôle dans l'activation des MAP kinases ERK1/2 induite par la stimulation du récepteur de chimioattractants FPRL1.

II-3 Effet de l'inhibition de la voie dépendante des protéines Gi

Dans le cas de la stimulation de certains RCPGs, comme le récepteur $AT_{1A}R$, il a été montré que les cinétiques d'activation de ERK1/2 dépendantes des protéines G ou de la β -arrestine 2 ont des profils différents (Ahn et al., 2004a). La déplétion en β -arrestine 2 par interférence ARN ne laisse persister que la voie d'activation dépendante de la protéine G. La cinétique est alors rapide et transitoire. Inversement, l'inhibition de la voie dépendante de la

protéine G par un inhibiteur de la PKC entraîne une forte diminution de l'activation de ERK1/2 dans la phase précoce de stimulation (Ahn et al., 2004a).

De façon similaire, la voie de signalisation dépendante des protéines G initiée par le récepteur FPRL1 a été inhibée. Ainsi les parts relatives d'éventuelles voies dépendantes des β -arrestines par rapport aux voies dépendantes des protéines G ont été examinées. La voie de signalisation dépendante des protéines G de type G_i , auxquelles sont couplés les récepteurs FPRL1, a été bloquée par traitement avec la toxine pertussique (PTX), qui provoque une ADP-ribosylation spécifique des sous-unités α_i des protéines G hétérotrimériques de type G_i et empêche toute signalisation émanant de cette protéine G.

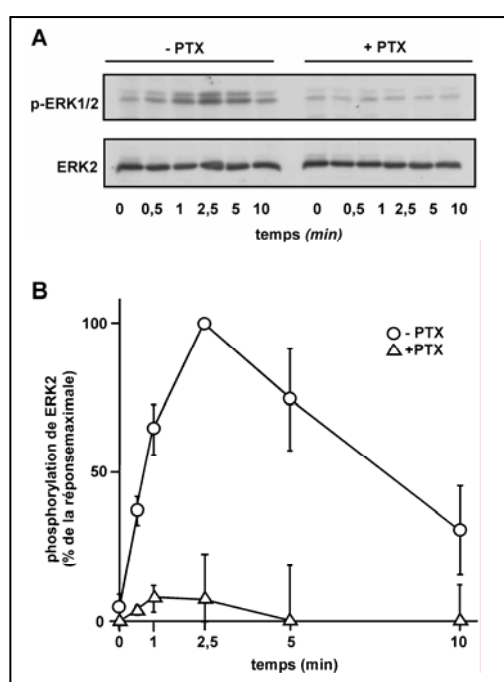


Figure 40 : Effet de la toxine pertussique sur l'activation des MAP kinases ERK1/2 dans les cellules HEK-293-FPRL1

Les cellules HEK-293-FPRL1 prétraitées ou non avec 100 ng/ml de PTX pendant 5 heures ont été stimulées avec 100 nM de peptide WKYMVM pendant différentes périodes. La cinétique de phosphorylation de ERK1/2 a été révélée par immunodétection, puis les signaux correspondants ont été quantifiés avec le logiciel ImageJ. Moyennes et écarts-types relatifs à 3 expériences.

Un traitement avec la PTX élimine complètement toute activation de ERK2 dans les cellules HEK-293-FPRL1 stimulées avec le peptide WKYMVM (Figure 40). Ces cellules expriment de manière constitutive les deux isoformes de β -arrestine. L'inhibition par la PTX de l'activation de ERK1/2 dans les cellules HEK-293-FPRL1 indique que, dans ce type cellulaire, l'activation des MAP kinases induite par la stimulation de FPRL1 se fait essentiellement par l'intermédiaire des protéines G_i .

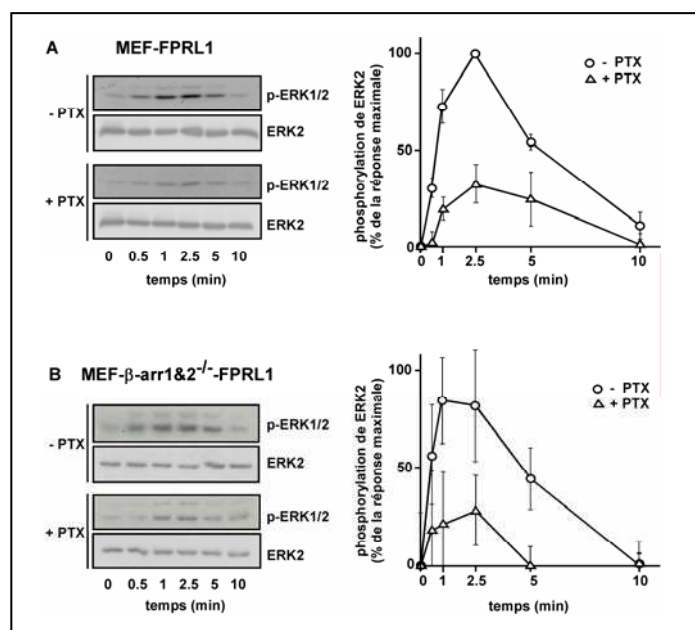


Figure 41 : Effet de la toxine pertussique sur l'activation des MAP kinases ERK1/2 dans les cellules MEF-FPRL1 déficientes ou non en β -arrestine

Les cellules MEF-FPRL1 de type sauvage (A) ou déficientes en β -arrestine (B) ont été stimulées par le peptide WKYMVM (100 nM). Ces cellules avaient été traitées au préalable pendant 5 heures avec 100 ng/ml de PTX (Δ) ou sans PTX (\circ). La cinétique de phosphorylation de ERK1/2 a été révélée par immunodétection, puis les signaux correspondants ont été quantifiés avec le logiciel ImageJ. Moyennes et écarts-types relatifs à 5 expériences.

Dans les cellules MEF-FPRL1 servant de contrôle, le prétraitement avec la toxine pertussique a pour effet de diminuer fortement la phosphorylation de ERK2 induite par la stimulation du récepteur FPRL1 par le peptide WKYMVM. Un taux de phosphorylation résiduelle d'environ 30 % par rapport aux mêmes cellules non traitées avec la toxine peut être observé (Figure 41A). Cette activité résiduelle pourrait être due à la présence des β -arrestines mais cette hypothèse est infirmée par la même expérience réalisée sur les MEF- β arr1&2^{-/-}-FPRL1. En effet, de façon similaire, environ 30 % du niveau d'activation maximal sans toxine sont retrouvés après le traitement pertussique des cellules déficientes en β -arrestine (Figure 41B). L'inhibition incomplète de la phosphorylation de ERK1/2 par la PTX dans les cellules MEF pourrait être due à un couplage partiel du récepteur à une protéine G hétérotrimérique d'un type autre que Gi et insensible à la toxine pertussique.

Un faible niveau de phosphorylation de ERK2 persiste après 5 minutes de stimulation des cellules MEF-FPRL1 de type sauvage, celui-ci est absent dans les cellules déficientes en β -arrestine. Une contribution éventuelle des β -arrestines dans les phases tardives de l'activation de ERK1/2 pourrait donc exister, même si cette hypothèse reste peu probable au vu des expériences réalisées sur les HEK-293-FPRL1.

II-4 Discussions

En résumé, ni la surexpression des β -arrestines, ni leur absence ne semblent modifier significativement la cinétique de phosphorylation des MAP kinases ERK1/2 induite par la stimulation du récepteur de chimioattractants FPRL1. La cinétique de phosphorylation de ERK1/2 observée est rapide et transitoire. Elle est similaire au profil d'activation observé après stimulation du récepteur AT_{1A}R dans des cellules HEK-293 lorsque l'expression de la β -arrestine 2 a été inhibée par interférence ARN (Ahn et al., 2004a). L'activation de ERK1/2 est totalement inhibée par la présence de PTX.

L'ensemble des expériences conduites suggère que, dans le cas du récepteur FPRL1 et contrairement aux récepteurs de l'angiotensine II type 1A (AT_{1A}R) et de la vasopressine, les voies de signalisation vers les MAP kinases sont dépendantes essentiellement des protéines G hétérotrimériques et pas des β -arrestines. Ces conclusions corrélerent avec un travail récent qui a été effectué sur le récepteur de chimioattractants FPR, homologue de FPRL1. L'activation des MAP kinases ERK1/2 suite à la stimulation de FPR semble en effet dépendre également principalement des protéines G et ne pas dépendre d'une interaction des β -arrestines avec le récepteur FPR (Gripentrog et Miettinen, 2005).

Le fait que l'activation des MAP kinases ERK1/2 ne dépende pas des β -arrestines pourrait être une propriété des récepteurs de chimioattractants adaptée à leurs fonctions cellulaires. Outre leur rôle dans la migration des leucocytes et les fonctions microbicides, les chimioattractants stimulent la transcription et la sécrétion de cytokines proinflammatoires, comme le TNF- α (Tumor Necrosis Factor α), et de chimiokines, comme l'interleukine 8. Le rôle habituellement observé des β -arrestines est de séquestrer les formes phosphorylées de ERK, empêchant leur translocation dans le noyau et l'activation de la transcription (cf. Introduction, § C/III-3-1). Il semble donc bénéfique pour les récepteurs de chimioattractants de signaler essentiellement par les protéines G et pas par les β -arrestines, pour assurer l'activation de facteurs de transcription qui régule la synthèse d'immunomodulateurs importants.

C/ Etude de la régulation des récepteurs des peptides N-formylés : phosphorylation et internalisation

I- Phosphorylation

La **phosphorylation** des récepteurs fait partie intégrante des mécanismes de désensibilisation des récepteurs puisqu'elle permet le recrutement des β -arrestines, le découplage du récepteur de sa protéine G et finalement l'internalisation du récepteur. Toutefois, la liaison du récepteur à la β -arrestine n'est pas toujours un prérequis pour empêcher l'interaction avec la protéine G. Dans le cas du récepteur FPR, il a été décrit que la phosphorylation suffit, à elle seule, pour provoquer le découplage (Bennett et al., 2001). Dans tous les cas décrits dans la littérature, la phosphorylation est requise pour induire l'internalisation du récepteur.

I-1 Etude des sites de phosphorylation du récepteur FPRL1

Les récepteurs couplés aux protéines G peuvent être phosphorylés au niveau de leur queue cytoplasmique C-terminale et également sur la troisième boucle cytoplasmique qui sépare les domaines transmembranaires V et VI. Cette phosphorylation intervient principalement sur des sérines et thréonines mais les profils de phosphorylation varient d'un récepteur à l'autre (cf. Introduction, § B/II-5-2-1).

Il existe des similitudes fortes au niveau de l'agencement de résidus potentiellement phosphorylables des queues C-terminales des récepteurs FPR et FPRL1 (Figure 13). La queue C-terminale du FPR contient 11 sérines et thréonines dont 8 sont des sites majeurs de phosphorylation après stimulation par agoniste.

Il a été montré que le récepteur FPRL1 est, lui aussi, rapidement phosphorylé après fixation de l'agoniste (Christophe et al., 2001) mais les résidus impliqués de manière primordiale et leur nature ne sont pas encore connus. La queue C-terminale du FPRL1 contient 10 sérines et thréonines potentiellement phosphorylables. Certains de ces résidus sont conservés par rapport à la séquence de la queue C-terminale du FPR mais l'agencement des sites potentiels de phosphorylation est quelque peu différent.

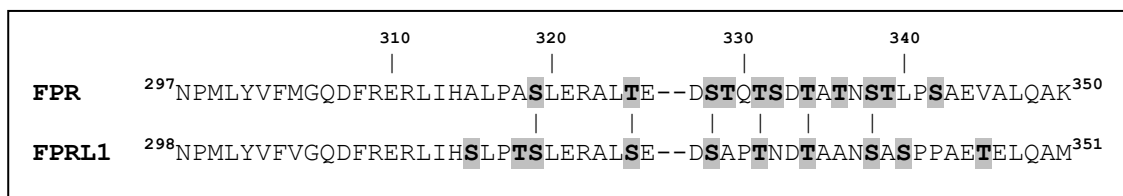


Figure 42 : Alignement des domaines C-terminaux des récepteurs FPR et FPRL1

Les résidus sérines et thréonines sont indiqués en gras sur fond gris.

I-1-1 Détermination de la nature des acides aminés phosphorylés du récepteur FPRL1

Pour déterminer la nature des sites de phosphorylation du récepteur FPRL1, une analyse des acides aminés phosphorylés a été menée sur le récepteur FPRL1 activé par le peptide WKYMVM. Ce peptide a été choisi car une étude antérieure avait montré qu'il est paradoxalement le plus efficace pour induire la phosphorylation de FPRL1, même si son affinité pour ce récepteur est moins bonne que celle du peptide WKYMVm (Christophe et al., 2001). Les cellules HEK-293-FPRL1 ont été marquées métaboliquement avec l'isotope 32 du phosphore puis activées par traitement avec le peptide WKYMVM. Le récepteur a été immunoprécipité et les acides aminés résultant de l'hydrolyse acide ménagée du récepteur ont été séparés par électrophorèse bidimensionnelle sur plaque de cellulose. La cartographie des acides aminés phosphorylés est présentée en Figure 43 et montre que le récepteur FPRL1 est phosphorylé uniquement sur des sérines et thréonines avec une forte prédominance des sérines.

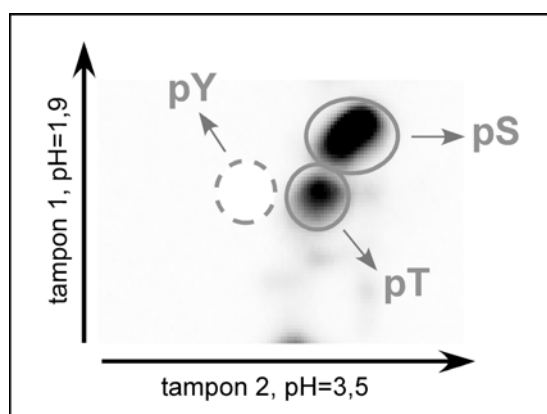


Figure 43 : Cartographie des acides aminés phosphorylés du récepteur FPRL1

Révélation au PhosphorImager des acides aminés ayant incorporé l'isotope 32 du phosphore lors de la phosphorylation de FPRL1 suite à la stimulation par le peptide WKYMVM (*pS* : *phospho-sérine*, *pT* : *phospho-thréonine*, *pY* : *phospho-tyrosine*).

I-1-2 Identification des sites majeurs de phosphorylation du récepteur FPRL1

Il existe 6 sérines plus 4 thréonines au niveau de la queue C-terminale et 2 sérines sur la troisième boucle cytoplasmique du récepteur FPRL1 (Figure 44). Compte tenu de la prédominance des sites de phosphorylation sur la queue cytoplasmique habituellement observée pour les RCPGs, les sites potentiels de phosphorylation du domaine C-terminal ont été mutés dans un premier temps. La thréonine 346 se situe dans le site de reconnaissance de l'anticorps anti-FPRL1 préparé au laboratoire. Cette thréonine n'a pas été remplacée par une alanine afin de maintenir intact l'épitope reconnu par l'anticorps et de ne pas modifier l'efficacité d'immunoprécipitation.

Les 9 sites potentiels de phosphorylation (6 sérines et 3 thréonines) à étudier ont été mutés en alanine par groupes de trois, que nous appelons clusters A, B et C, définis selon leur position (Figure 44) :

- cluster A : T³³⁵, S³³⁹ et S³⁴¹
- cluster B : S³²⁶, S³²⁹ et T³³²
- cluster C : S³¹⁶, T³¹⁹ et S³²⁰.

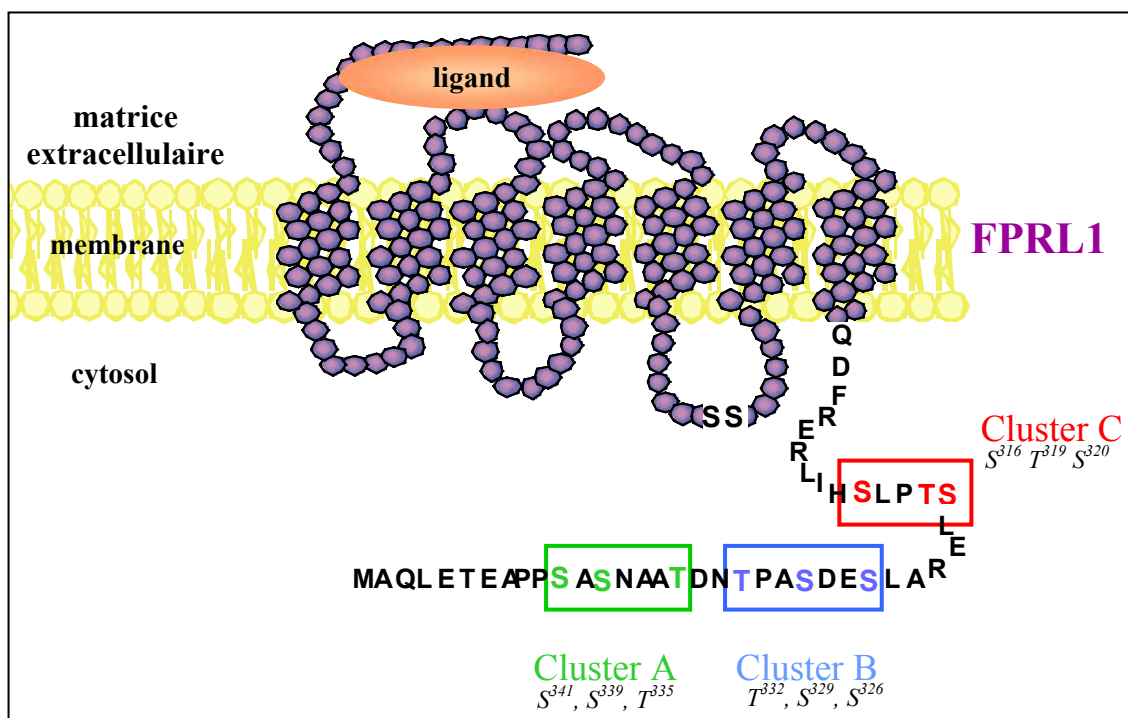


Figure 44 : Schématisation du récepteur FPRL1 avec ses sites potentiels de phosphorylation regroupés en clusters

Des combinaisons de clusters mutés ont été réalisées jusqu'à obtenir un mutant modifié au niveau des 9 sites potentiels de phosphorylation, l'ensemble des mutants est présenté en Tableau 8.

Mutants	Séquence C-terminale
FPRL1 WT	³¹³ LIH S LP TS LERAL S ED S APT T ND T AAN S A S PPAETELQAM ³⁵¹
FPRL1-mutA	--- S --- TS ----- S --- S --- T --- A --- A -----
FPRL1-mutB	--- S --- TS ----- A --- A --- A --- T --- S --- S -----
FPRL1-mutC	--- A --- AA ----- S --- S --- T --- T --- S --- S -----
FPRL1-mutAB	--- S --- TS ----- A --- A --- A --- A --- A --- A -----
FPRL1-mutAC	--- A --- AA ----- S --- S --- T --- A --- A --- A -----
FPRL1-mutBC	--- A --- AA ----- A --- A --- A --- T --- S --- S -----
FPRL1-mutABC	--- A --- AA ----- A --- A --- A --- A --- A --- A -----

Tableau 8 : Séquences C-terminales des mutants de phosphorylation de FPRL1

Les résidus potentiellement phosphorylables sont indiqués par un marquage rouge. Les mutations en alanine sont en caractères gras et noirs. Le mutant ABC ne présente plus aucun résidu phosphorylable sur le domaine C-terminal.

Pour obtenir les mutants du récepteur FPRL1, une stratégie de mutagenèse par PCR en plusieurs étapes, adaptée de la méthode de Yon & Fried (Yon et Fried, 1989), a été choisie, elle est détaillée dans le paragraphe B/III-2 des Matériels et Méthodes. Chaque mutant a été introduit dans le vecteur d'expression pcDNA3.1.

Les plasmides codant les différentes formes de FPRL1 ont été introduits dans les cellules HEK-293T qui permettent une expression forte du transgène. Comme précédemment, les cellules ont été marquées métaboliquement avec l'acide orthophosphorique ³²P puis activées par traitement avec le peptide WKYMVM. Le récepteur présent dans les lysats cellulaires a été immunoprécipité et l'intensité de sa phosphorylation révélée au PhosphorImager après séparation des protéines par SDS-PAGE. Afin de déterminer l'importance de chaque cluster sur la phosphorylation de FPRL1, les intensités de phosphorylation des formes sauvage ou mutées du récepteur FPRL1 ont été comparées.

Cette comparaison ne peut être faite que si les cellules présentent un nombre équivalent de récepteurs pour chaque mutant testé. Chaque boîte de culture a étéensemencée avec le même nombre de cellules et transfectée avec la même quantité d'ADN. De plus, il a été vérifié par fixation de ligand radioactif que le nombre de récepteurs en surface était du même ordre de grandeur pour les différentes formes de récepteur transfectées.

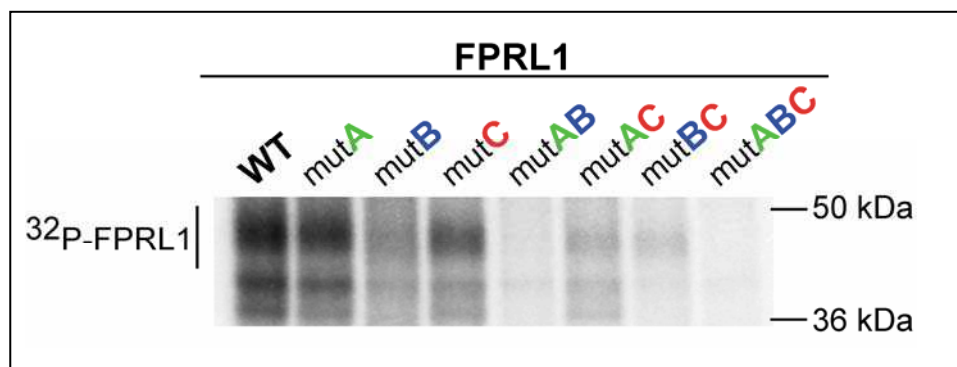


Figure 45 : Phosphorylation des mutants du récepteur FPRL1

Les différentes formes du récepteur FPRL1 ont été exprimées de façon transitoire dans des cellules HEK-293T marquées métaboliquement au phosphore ^{32}P et activées par le peptide WKYMVM (1 μM , 15 min). Les lysats cellulaires ont été immunoprécipités et séparés par SDS-PAGE avant révélation du signal radioactif avec un PhosphorImager.

Les essais ont été réalisés indépendamment trois fois et les résultats obtenus étaient qualitativement reproductibles. La Figure 45 en montre une image représentative. On peut tout d'abord remarquer une absence totale de phosphorylation du mutant FPRL1-mutABC (Figure 45, dernière piste), alors que le récepteur sauvage présente un signal de phosphorylation assez intense. Cette observation étaye l'hypothèse que les sites de phosphorylation du récepteur FPRL1 se trouvent exclusivement sur les trois clusters, c'est-à-dire sur la queue C-terminale, et que les deux sérines de la troisième boucle cytoplasmique ne participent pas à la phosphorylation de FPRL1 suite à sa stimulation par le peptide WKYMVM.

Les mutations des sérines/thréonines du cluster B entraînent une diminution significative du signal de phosphorylation par rapport au récepteur sauvage, alors que les mutations au niveau du cluster A n'ont aucun effet et que les mutations du cluster C n'affectent qu'assez peu l'intensité de phosphorylation du récepteur. Il semblerait donc que le cluster B comprenne les sites de phosphorylation prépondérants. De même, parmi les combinaisons de clusters mutés deux à deux, ce sont celles comprenant le cluster B muté (FPRL1-mutAB ou -mutBC) qui présentent l'effet le plus drastique sur la diminution de

phosphorylation du récepteur. La phosphorylation du mutant FPRL1-mutAC, qui possède toujours les sérines/thréonines phosphorylables du cluster B, est elle aussi diminuée par rapport au récepteur sauvage, mais moins affectée que pour les mutants AB et BC. Les observations sur l'intensité de phosphorylation des mutants simples et doubles convergent donc vers une activité prépondérante des résidus du cluster B dans la phosphorylation du récepteur FPRL1. Les sérines et thréonines présentes dans les deux autres clusters A et C sont tout de même impliquées dans la phosphorylation du récepteur puisqu'il faut muter l'ensemble des trois clusters pour annihiler complètement la phosphorylation induite par la stimulation de FPRL1 par le peptide WKYMVM.

I-1-3 Perspectives

Les conclusions des travaux présentés ci-dessus sont des résultats préliminaires à une étude plus détaillée du processus de phosphorylation de FPRL1. Une telle étude a été menée au laboratoire sur le récepteur de l'anaphylatoxine C5a (Christophe et al., 2000; Giannini et al., 1995; Naik et al., 1997) et dans une autre équipe sur le récepteur FPR (Maestes et al., 1999). Il a été montré dans les deux cas que les étapes de cette phosphorylation répondent à un processus hiérarchique.

L'étude menée sur les mutants du récepteur FPRL1 suggère que les sérines de la troisième boucle cytoplasmique ne sont pas phosphorylées. Toutefois, il est possible que la phosphorylation complète du récepteur FPRL1 sauvage soit soumise à un processus hiérarchique dans lequel la phosphorylation des sérines/thréonines du domaine C-terminal serait un prérequis à la phosphorylation d'autres résidus. Dans ce cas, même si les résidus sérines de la troisième boucle intracellulaire sont des sites effectifs de phosphorylation, leur phosphorylation pourrait être empêchée par l'absence de résidus phosphorylables dans la queue C-terminale. Par conséquent, même si il est fort probable que les sites effectifs de phosphorylation de FPRL1 soient concentrés au niveau de la queue C-terminale du récepteur, on ne peut totalement exclure que les sérines de la troisième boucle intracellulaire puissent être phosphorylées.

La phosphorylation est un processus capital dans la régulation des récepteurs car elle conditionne l'interaction des récepteurs avec les β -arrestines et leur internalisation. Il a été

montré, au laboratoire, que certains résidus sérines étaient nécessaires et suffisants à l'interaction du C5aR avec les β -arrestines et à leur internalisation (Braun et al., 2003) et qu'une forme mutée du C5aR présentant un défaut total de phosphorylation n'était pas capable d'être internalisée (Naik et al., 1997). Le récepteur FPRL1 sauvage interagit avec les β -arrestines fusionnées à l'EGFP lors de la stimulation par le peptide WKYMVM (Huet et al., 2007, *Cell. Signal.*, sous presse, et cf. § C/II-1). Des expériences similaires à celles utilisées dans le cas du récepteur C5aR pourraient être réalisées en co-exprimant de manière transitoire les différentes formes mutées de FPRL1 avec les protéines de fusion β -arrestines fluorescentes. Ainsi, il serait possible de déterminer les sites majeurs de phosphorylation impliqués dans le recrutement des β -arrestines par le FPRL1, comme cela a été fait pour les récepteurs FPR et C5aR, pour lesquels une phosphorylation partielle suffit pour que l'interaction avec la β -arrestine 1 ait lieu (Bennett et al., 2001; Braun et al., 2003).

Les résultats d'analyses préliminaires en immunofluorescence semblent montrer que les mutations affectant les sérines/thréonines du cluster B entraînent un défaut d'internalisation du récepteur. Ces observations purement qualitatives devront être étayées par des données quantitatives, par exemple grâce à des expériences d'internalisation de ligand radioactif.

I-2 Etude de la phosphorylation de chimères des récepteurs FPRL1 et FPRL2

Contrairement aux récepteurs FPR et FPRL1, dont la phosphorylation dépend de la fixation de l'agoniste, le récepteur FPRL2 est fortement phosphorylé en absence de stimulation (Christophe et al., 2001). Cette phosphorylation basale est surprenante dans la mesure où le récepteur FPRL2 possède un fort degré d'identité avec FPRL1. La construction de chimères entre les deux récepteurs par échange des régions C-terminales (Figure 46) a permis d'étudier si cette phosphorylation est inhérente à la structure de la queue C-terminale ou résulte d'une conformation active du récepteur.

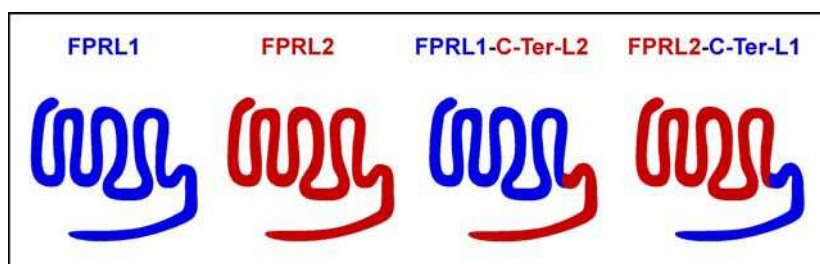


Figure 46 : Schématisation des chimères entre les récepteurs FPRL1 et FPRL2

Le clonage des chimères a été réalisé par échange des fragments *PvuII* / *NheI* des vecteurs pcDNA3.1-FPRL1 et pcDNA3.1-FPRL2. Le site *PvuII* se situe quelques bases en amont du domaine conservé "NPxxY" marquant le début de la queue cytoplasmique (Figure 47).

	<div>PvuII</div>													
FPRL1	aac	agc	tgc	ctc	aac	ccc	atg	ctt	tac//.....	gca	atg	tga	
	N	S	C	L	N	P	M	L	Y//.....	A	M	stop	
	<div>PvuII</div>													
FPRL2	aac	agc	tgc	ctc	aac	cca	att	ctc	tac//.....	gca	atg	tga	
	N	S	C	L	N	P	I	L	Y//.....	A	M	stop	

Figure 47 : Séquences des queues cytoplasmiques de FPRL1 et FPRL2

Le site *PvuII* utilisé pour l'échange des domaines C-terminaux est surligné en jaune et le motif "NPxxY" marquant le début de la queue cytoplasmique en vert.

Les récepteurs FPRL1, FPRL2 et les deux chimères ont été exprimés. Après marquage métabolique au phosphore ³²P, la phosphorylation des récepteurs a été examinée. Les cellules n'ont pas été stimulées. Les récepteurs ont été immunopurifiés avec les anticorps polyclonaux anti-FPRL1 préparés au laboratoire, ces anticorps dirigés contre les 10 derniers acides aminés de FPRL1 (PPAETELQAM) réagissent également avec le récepteur FPRL2 dont la séquence C-terminale (PPEETELQAM) est très similaire à celle de FPRL1.

La Figure 48 présente une révélation au PhosphorImager du signal radioactif de phosphorylation constitutive des récepteurs et des chimères. Comme précédemment décrit (Christophe et al., 2001), le récepteur FPRL2 migre sur gel SDS-PAGE avec une masse moléculaire relative de 70-80 kDa et présente une phosphorylation constitutive d'une forte intensité, alors qu'aucune phosphorylation basale n'est détectable pour FPRL1. Il apparaît clairement que la chimère composée de la partie N-terminale de FPRL1 et de la queue C-terminale de FPRL2 n'est pas phosphorylée de manière constitutive (Figure 48, pistes 1 et 3). Par contre, le récepteur FPRL2 montre le même profil de phosphorylation basale intense qu'il soit sauvage ou que sa queue C-terminale ait été remplacée par celle de FPRL1 (Figure 48, pistes 2 et 4).

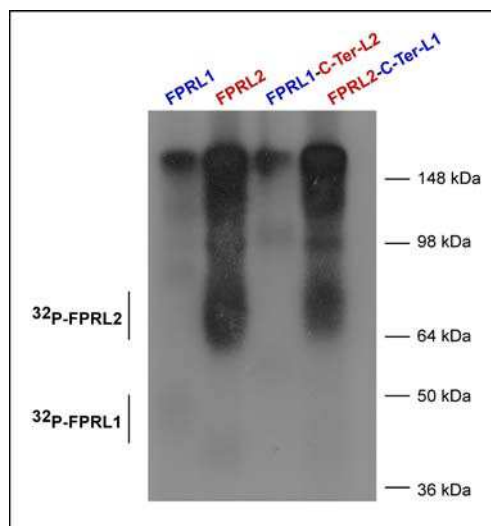


Figure 48 : Phosphorylation basale des récepteurs FPRL1 et 2 et de leurs chimères

Les récepteurs FPRL1, FPRL2 et les deux formes chimériques ont été exprimées de façon transitoire dans des cellules HEK-293T. Après marquage métabolique au phosphore ^{32}P , les lysats de ces cellules non stimulées ont été immunoprécipités et séparés par SDS-PAGE avant révélation du signal radioactif avec un PhosphorImager.

Il semblerait par conséquent que la phosphorylation basale de FPRL2 résulte d'une conformation active du récepteur ou, tout du moins, de la partie excluant la queue C-terminale. Cependant, la question de savoir si la phosphorylation basale observée est due à une phosphorylation sur la queue C-terminale et/ou sur les deux sérines de la 3^{ème} boucle cytoplasmique n'est pas élucidée. Pour y répondre, une nouvelle chimère a été construite. Celle-ci correspond au récepteur FPRL2-C-Ter-L1-mutABC, dans lequel la queue cytoplasmique ne présente plus aucun résidu phosphorylable. Ainsi, si une phosphorylation constitutive de ce récepteur est observée, il pourra être conclu que ce sont les sérines de la boucle intracellulaire qui sont le siège de la phosphorylation constitutive de FPRL2. Les expériences relatives à cette chimère seront menées prochainement.

II- Etude du rôle des β -arrestines dans l'internalisation du récepteur FPRL1

L'**internalisation** des récepteurs couplés aux protéines G est le mécanisme principal de régulation de leur activité. La plupart de ces récepteurs utilisent des voies d'endocytose par les puits mantelés de clathrine et qui dépendent de l'association du récepteur avec les β -arrestines. Il a été montré que l'internalisation du récepteur FPRL1 est dépendante de la clathrine et de la dynamine (Ernst et al., 2004). Un rôle effectif des β -arrestines dans ce mécanisme n'a pas encore été démontré.

II-1 Etude de l'association des β -arrestines avec le récepteur FPRL1

Les cellules HEK-293 exprimant de façon stable le récepteur FPRL1 ont été transfectées de manière transitoire avec chacune des β -arrestines fusionnées dans leur partie C-terminale avec la protéine EGFP (Enhanced Green Fluorescent Protein). Ainsi la localisation de ces protéines peut être suivie grâce à la fluorescence verte de l'EGFP. Le récepteur FPRL1 est visualisé par immuno-marquage à l'aide d'un anticorps polyclonal anti-FPRL1 et d'un anticorps secondaire couplé à l'alexa 568 qui émet une fluorescence rouge. Des résultats identiques ont été obtenus avec les deux isoformes de β -arrestine. Aussi, seuls les résultats relatifs à l'une de ces isoformes sont présentés en Figure 49.

Dans les cellules non activées, la localisation du récepteur FPRL1 à la membrane plasmique est indiquée par un marquage rouge fluorescent en périphérie cellulaire. La β -arrestine 2 est distribuée uniformément dans le cytoplasme. Aucune co-localisation de ces deux protéines n'est détectée (Figure 49). L'ajout du peptide WKYMVM mène à la redistribution du récepteur en amas ponctiformes dans la région périnucléaire du cytoplasme. L'association de la β -arrestine avec le récepteur dans ces vésicules d'endocytose est clairement visible à 5 minutes de stimulation, où la couleur jaune après la superposition des images dénote une co-localisation de ces deux protéines. L'association de la β -arrestine avec le récepteur est prolongée puisque la co-localisation des deux protéines est maintenue à 30 minutes (Figure 49, panneau inférieur). Les deux isoformes de β -arrestine s'associent donc au récepteur FPRL1 durant son endocytose et cette interaction est prolongée.

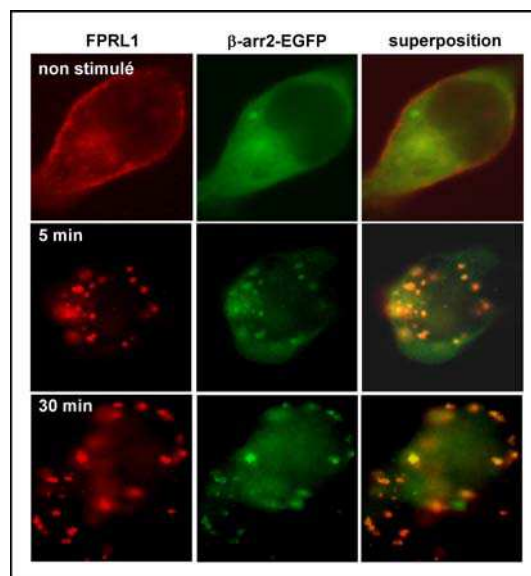


Figure 49 : Co-localisation de la β -arrestine 2-EGFP et du récepteur FPRL1

Les HEK-293-FPRL1 exprimant de façon transitoire la β -arrestine 2-EGFP ont été stimulées ou non par le peptide WKYMVM (100 nM). Les cellules ont été traitées selon le protocole d'immunofluorescence avec fixation à la paraformaldéhyde et utilisation des anticorps commerciaux dirigés contre FPRL1.

II-2 Etude du rôle des β -arrestines dans l'internalisation du récepteur FPRL1

FPRL1 s'associe aux β -arrestines durant son internalisation (cf. ci-dessus) mais la dépendance de ce mécanisme d'internalisation vis-à-vis des β -arrestines n'est pas connue. La capacité du récepteur FPRL1 à être internalisé a été examinée dans des fibroblastes d'embryons de souris (MEF) présentant des déficiences en β -arrestine. Les lignées MEF-FPRL1 et MEF- β -arr1&2^{-/-}-FPRL1 avaient été établies en vue de l'étude du rôle des β -arrestines dans la signalisation (cf. section B). Le récepteur FPRL1 a été également exprimé de façon stable dans des cellules MEF déficientes en β -arrestine 1 (MEF- β arr1^{-/-}-FPRL1) ou en β -arrestine 2 (MEF- β arr2^{-/-}-FPRL1).

Les analyses d'immunofluorescence menées sur les cellules MEF-FPRL1 montrent que, après une longue période de stimulation (45 minutes avec 100 nM WKYMVM), le récepteur FPRL1 est localisé dans des vésicules intracellulaires réparties dans le cytosol ainsi que dans un compartiment périnucléaire (Figure 50, panneaux de gauche). Dans les cellules déficientes en β -arrestine stimulées dans les mêmes conditions, le récepteur FPRL1 est détecté à la membrane plasmique et n'est pas internalisé (Figure 50, panneaux de droite). L'absence de l'une ou l'autre isoforme de β -arrestine ne semble pas empêcher l'internalisation du récepteur

puisque des vésicules d'internalisation du récepteur sont visibles après stimulation des cellules MEF- β -arr1^{-/-}-FPRL1 ou MEF- β -arr2^{-/-}-FPRL1. Chacune des isoformes de β -arrestine semble donc capable de compenser l'absence de l'autre.

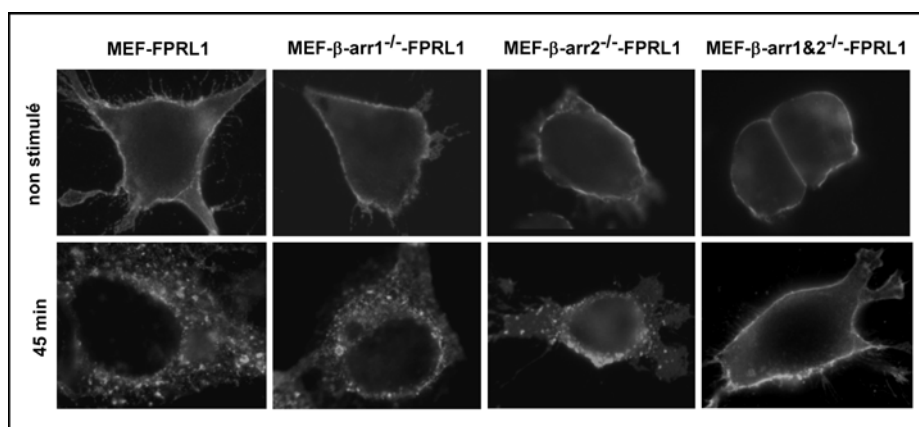


Figure 50 : Internalisation du récepteur FPRL1 révélée par immunofluorescence dans les cellules MEF déficientes ou non en β -arrestine

Les cellules MEF-FPRL1 déficientes ou non en β -arrestine ont été stimulées ou non par le peptide WKYMVM (100 nM). Les cellules ont été traitées selon le protocole d'immunofluorescence avec fixation à l'acétone et utilisation des anticorps du laboratoire dirigés contre FPRL1.

Le défaut d'internalisation du récepteur FPRL1 dans les cellules déficientes en β -arrestine a été quantifié par des expériences de séquestration de ligand radioactif. Comme le montre la Figure 51, les cellules de type sauvage induisent la séquestration du peptide WKYMVM marqué à l'isotope 125 de l'iode à raison de ~25 % du ligand spécifiquement lié à la surface de la cellule. Les cellules déficientes en β -arrestine montrent une réduction d'un facteur 4 pour la séquestration de ce ligand. Les β -arrestines sont donc indispensables à une internalisation efficace du récepteur FPRL1.

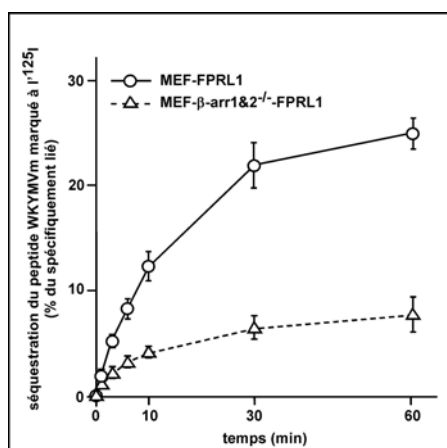


Figure 51 : Séquestration de ligand radioactif dans les cellules MEF déficientes ou non en β -arrestine

L'internalisation a été initiée par ajout du peptide WKYMVM marqué à l'iode ¹²⁵I. La radioactivité est mesurée dans le lysat des cellules préalablement lavées par traitement acide pour éliminer le peptide lié à la surface des cellules. Les résultats sont exprimés en pourcentage de peptide radioactif séquestré par rapport au peptide spécifiquement lié selon la formule

$$= \frac{\text{cpm "résistants au lavage acide"}}{\text{cpm "spécifiquement liés à 4°C"}} \cdot \text{Moyennes et écarts-types relatifs à 5 expériences.}$$

II-3 Discussion

Malgré une forte homologie de séquences entre les récepteurs FPR et FPRL1, l'internalisation de ces deux récepteurs semble faire intervenir des mécanismes différents. Alors que le récepteur FPR est capable d'utiliser une voie d'endocytose indépendante des β -arrestines, de la dynamine et de la clathrine, le récepteur de chimioattractants FPRL1 utilise principalement une voie d'endocytose dépendante de la clathrine (Ernst et al., 2004). L'utilisation de siRNA dirigés contre la clathrine ou l'expression d'un dominant négatif de la dynamine, qui mènent tous deux à l'inhibition de la formation des puits mantelés de clathrine, empêchent l'internalisation du récepteur FPRL1 (Ernst et al., 2004). De plus, il a été montré ici que l'internalisation de FPRL1 nécessite la présence d'au moins une des deux isoformes de β -arrestine.

Une différence de comportement endocytaire vis-à-vis des β -arrestines entre des récepteurs de structure très proches a déjà été rapportée. Il a par exemple été montré que le récepteur purinergique P2Y₁ est internalisé sans les β -arrestines alors que son homologue P2Y₁₂ l'est par une voie dépendante des arrestines (Mundell et al., 2006).

Il apparaît dans notre présente étude que chacune des isoformes de β -arrestine permette l'internalisation du récepteur FPRL1. Le même comportement a été rapporté dans le cas du récepteur de l'angiotensine II type 1A (AT_{1A}R). Il existe tout de même une spécificité de ces isoformes pour l'internalisation de certains récepteurs, comme pour le β_2 AR qui est internalisé principalement grâce à la β -arrestine 2 (Kohout et al., 2001).

Les récepteurs qui sont internalisés grâce à des mécanismes dépendants des β -arrestines peuvent être séparés en deux classes selon leur capacité à rester associés aux β -arrestines durant leur internalisation, les récepteurs de classe A et B (cf. Introduction, § C/III-1-2). Les caractéristiques moléculaires déterminant la formation d'un complexe stable entre les récepteurs et les β -arrestines, c'est-à-dire la classification B, ont pu être identifiées. Il s'agit de clusters spécifiques de sérines et thréonines présents au niveau la queue C-terminale des récepteurs. Ces clusters présentent au moins 3 sérines ou thréonines parmi 4 résidus successifs. Ils sont très conservés dans leur position parmi les récepteurs de classe B et quasiment absents du domaine C-terminal des récepteurs de classe A (Oakley et al., 1999; Oakley et al., 2001). Apparemment, ces déterminants moléculaires ne seraient pas les seuls à

être mis en jeu dans la stabilité de l'interaction entre le récepteur et les β -arrestines. En effet, dans la présente étude, l'interaction prolongée entre le récepteur FPRL1 et les β -arrestines positionne sans équivoque ce récepteur parmi ceux de classe B. Pourtant, les clusters de sérines et thréonines du domaine C-terminal du récepteur FPRL1 ne présentent au maximum que 3 sérines et thréonines parmi 5 résidus successifs et ne répondent pas à des critères aussi drastiques que ceux développés par Oakley *et al.* (Oakley et al., 2001).

Les β -arrestines influencent le destin du récepteur FPR en régulant son trafic post-endocytaire. Dans les cellules déficientes en β -arrestine, FPR est dirigé vers le compartiment de recyclage périnucléaire mais ne recycle pas à la membrane plasmique (Vines et al., 2003). La présence d'une arrestine mutée (mutation lui conférant une conformation active) inhibe le recyclage du FPR (Key et al., 2005). Cette inhibition est levée lorsque le récepteur est partiellement phosphorylé. Le recyclage de ce récepteur dépend donc d'une interaction fonctionnelle avec la β -arrestine et de la stabilité du complexe récepteur / β -arrestine mais également de l'état de phosphorylation du récepteur. La façon dont les β -arrestines régulent le recyclage des récepteurs n'est pas encore connue. De la même manière, la capacité des β -arrestines à rester associée avec FPRL1 pourrait réguler sa déphosphorylation et finalement sa cinétique de resensibilisation.

D/ Etude protéomique globale des complexes formés autour du couple "récepteur FPRL1 / β -arrestine"

Les β -arrestines sont des protéines d'échafaudage qui interagissent avec les RCPGs activés. Autour du couple récepteur/ β -arrestine se forment des complexes multiprotéiques impliqués non seulement dans l'internalisation des récepteurs, mais aussi dans la signalisation intracellulaire (cf. Introduction, section C/III).

Une étude protéomique globale a été menée pour tenter de déterminer la composition de ces complexes. Les complexes ont été purifiés dans des conditions permettant de préserver au mieux les assemblages protéiques, puis leur composition a été établie par spectrométrie de masse nanoLC-MS/MS et analyse informatique. Cette étude a été réalisée grâce à une subvention du CNRS (2005-2006) dans le cadre du programme "Protéomique et génie des protéines" et en collaboration avec la plate-forme protéomique de la Génopole Rhône-Alpes (laboratoire "Etude de la Dynamique des Protéomes", EDyP, iRTSV, CEA Grenoble, dirigé par le Dr. Jérôme Garin).

I- Purification des complexes par la méthode TAP (Tandem Affinity Purification)

La méthode TAP ou **purification par affinité en tandem** a été mise au point chez la levure dans le laboratoire de Bertrand Séraphin à l'EMBL Heidelberg à la fin du XX^{ème} siècle (Rigaut et al., 1999). La première publication faisant état d'une utilisation systématique de cette technique est parue en 2002 dans le journal *Nature* (Gavin et al., 2002). Dans ce travail chez la levure *S. cerevisiae*, 1739 gènes ont pu être fusionnés à l'étiquette TAP par recombinaison homologue, plus de 1000 protéines étiquetées ont pu être exprimées et 589 complexes multiprotéiques purifiés. Un nouveau rôle potentiel a pu être assigné à 344 protéines. Après avoir été élaborée chez la levure, la méthode TAP a été utilisée avec succès dans de nombreux organismes, tels que la bactérie (Gully et al., 2003), les plantes (Rohila et al., 2004), la drosophile (Veraksa et al., 2005) et les cellules de mammifères (Benzinger et al., 2005; Bouwmeester et al., 2004; Cox et al., 2002; Westermarck et al., 2002). Ainsi, le déchiffrement de la voie de signalisation TNF- α /NF- κ B dans les cellules de mammifères a pu être réalisé (Bouwmeester et al., 2004). Dans cette étude, les complexes formés autour d'une

trentaine de molécules connues ou potentielles de la voie NF- κ B ont été isolés et analysés. Une carte du réseau des interactions impliquées a pu être réalisée et de nouveaux modulateurs de cette voie ont pu être identifiés. Plus récemment, pour éviter qu'une surexpression de la protéine étiquetée n'entraîne la formation de complexes non physiologiques, l'étiquette TAP a été incorporée dans un vecteur rétroviral bicistronique permettant de contrôler le niveau d'expression (Knuesel et al., 2003).

La méthode TAP est basée sur un **étiquetage** particulier de la protéine d'échafaudage du complexe. Le principal avantage de cette méthode est qu'elle fait appel à deux étapes successives de chromatographie de forte affinité tout en permettant des éluions dans des conditions non dénaturantes qui préservent au mieux l'intégrité des complexes formés autour de la protéine étiquetée. Le degré de pureté du complexe est compatible avec une analyse en spectrométrie de masse.

L'étiquette TAP (ou TAP-TAG) est tripartite (Figure 52). Elle se compose :

- d'une double répétition du domaine de la protéine A de *Staphylococcus aureus* liant les Immunoglobulines G (IgG), (appelé pour simplification "**ProtA**" dans la suite du document)
- du site de reconnaissance et de clivage de la protéase **TEV** (protéase issue d'un virus s'attaquant aux feuilles des plants de tabac ou de tomates, Tobacco Etch Virus, Dougherty et al., 1989)
- et d'un peptide liant la calmoduline (**CBP** pour Calmodulin Binding Peptide).

Cette étiquette peut être placée aux extrémités N- ou C-terminales de la protéine d'échafaudage. Durant ce travail de thèse, seule l'étiquette en C-terminal a été utilisée (Figure 52). En N-terminal, l'agencement des trois domaines est inversé afin de toujours garder la partie ProtA vers l'extérieur de la protéine étiquetée.

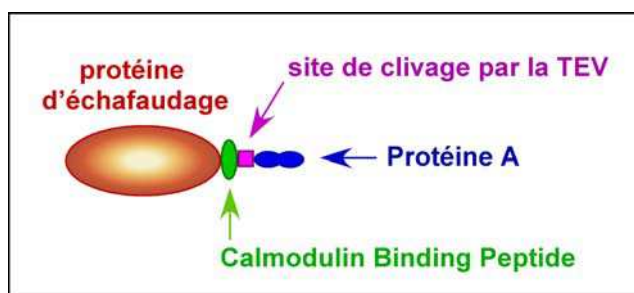


Figure 52 : Schématisation de l'étiquetage TAP en C-terminal

La purification des complexes formés *in vivo* est réalisée à partir d'un lysat cellulaire en deux étapes (Figure 53). La première étape est une purification par affinité utilisant des billes auxquelles ont été couplées des IgGs qui interagissent fortement avec la protéine A. Les molécules fixées sont éluées par clivage par la protéase TEV. Dans la deuxième étape de purification, cet éluat est incubé en présence de calcium avec des billes recouvertes de calmoduline. Après lavage, le matériel protéique retenu sur les billes est élué par l'ajout d'EGTA qui chélate le calcium et dissocie l'interaction CBP/calmoduline. Cette deuxième étape de purification est nécessaire pour éliminer non seulement les derniers contaminants du lysat cellulaire, mais aussi un contaminant introduit durant la purification, à savoir la protéase TEV. Les protéines qui composent le complexe purifié peuvent alors être identifiées grâce à une analyse par spectrométrie de masse.

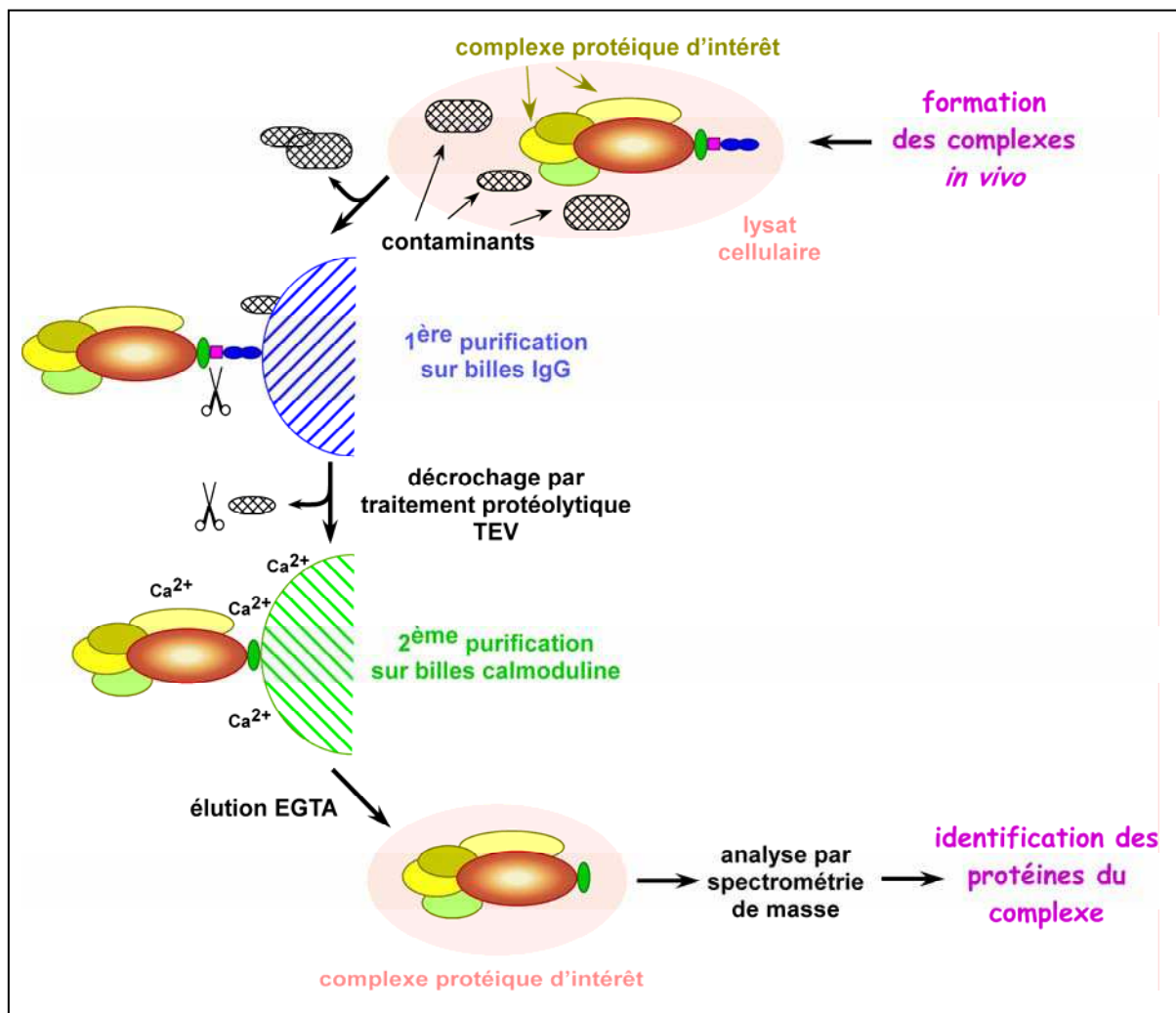


Figure 53 : Schéma de la méthode TAP de purification et d'analyse de complexes protéiques

II- Vecteurs d'expression

Des vecteurs d'expression permettant l'expression des β -arrestines ou du récepteur FPRL1 fusionnés à l'étiquette TAP dans les cellules mammifères HEK-293 et HL-60 ont été construits.

Toutes les constructions ont été réalisées à partir de la séquence du TAP-TAG du vecteur **pZome1C**[®], propriété de la société Cellzome et mis à disposition des centres de recherche académique par le consortium EUROSCARF (EUROpean Saccharomyces Cerevisiae ARchive for Functional analysis). Le détail des constructions est exposé dans la section Matériels et Méthodes (§ B/III-3).

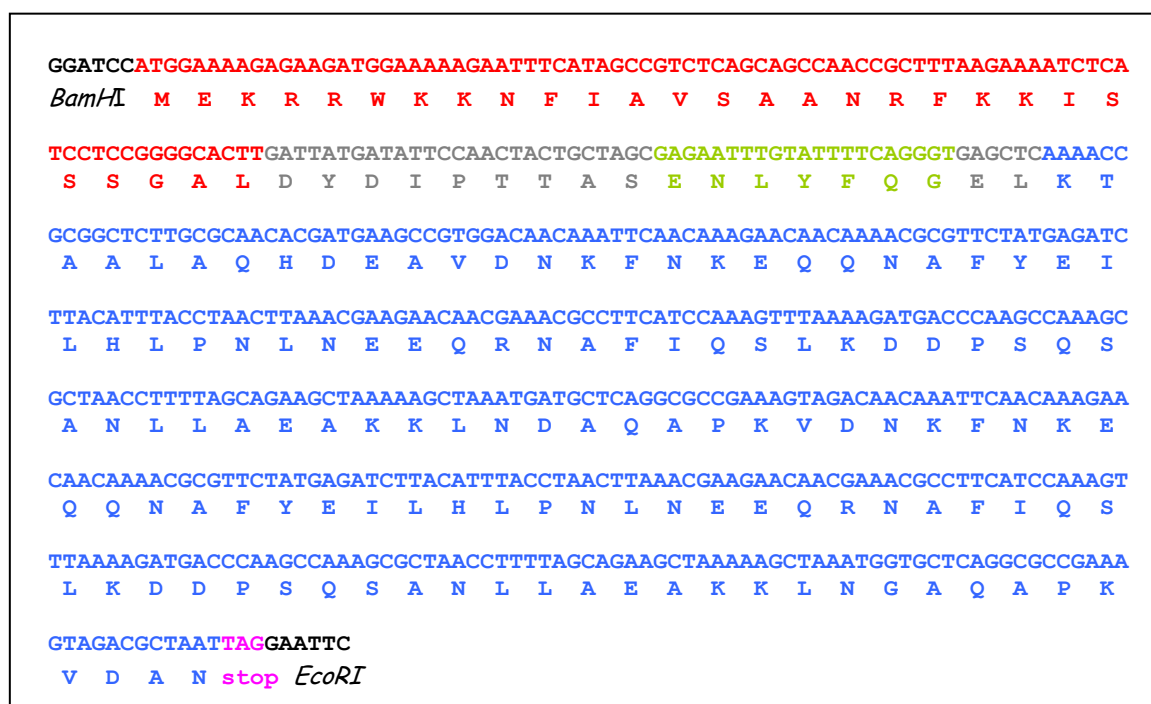


Figure 54 : Séquence du TAP-TAG du vecteur pZome1C[®]

Cette séquence est composée des ADNc codant le fragment **CBP**, le **site de reconnaissance de la protéase TEV**, et la partie **ProtA**. Deux séquences aléatoires codent des fragments peptidiques utilisés comme **espaceurs** autour du site de reconnaissance de la protéase.

III- La purification par affinité en tandem appliquée aux β -arrestines

III-1 Mise au point de la purification par la méthode TAP

Afin de vérifier l'expression protéique et de mettre au point la technique de purification TAP appliquée aux β -arrestines, des travaux préliminaires ont été réalisés après expression transitoire de la β -arrestine 1 étiquetée TAP dans les cellules HEK-293.

Une première purification a été réalisée à petite échelle sur 10^6 cellules. Des aliquots ont été prélevés lors de chaque étape de la purification et la présence de la β -arrestine 1 étiquetée a été examinée dans chacun de ces aliquots par Western blot et immunodétection avec les anticorps anti- β -arrestine 1. Le résultat de cette immunodétection est présenté en Figure 55. L'expression de la protéine étiquetée est révélée par une bande intense à la hauteur approximative de 75 kDa dans le lysat cellulaire (piste 1). L'élution des billes d'IgG-agarose par traitement protéolytique à la TEV est efficace puisque des protéines reconnues par l'anticorps β -arrestine 1 sont retrouvées dans l'éluat de la première étape de purification (piste 3). Ces protéines migrent avec une masse approximative de 60 kDa compatible avec la masse de la β -arrestine 1 TAP qui a perdu, après protéolyse, la partie ProtA (~15 kDa). Enfin, l'élution finale permet la récupération de la protéine étiquetée clivée (piste 6).

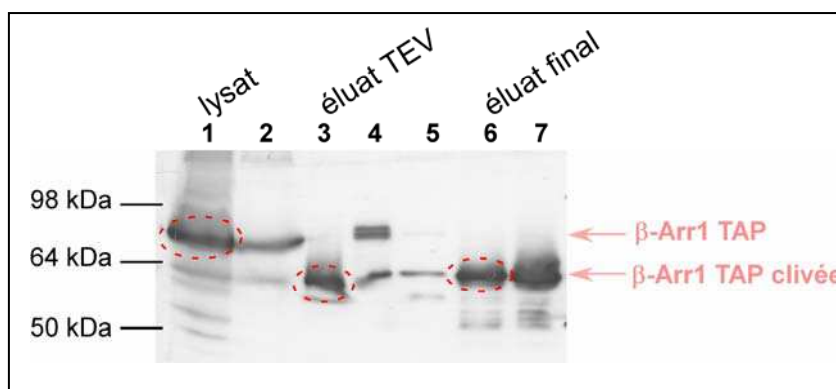


Figure 55 : Les étapes de la purification TAP vues par immunodétection de la β -arrestine 1 étiquetée

La purification a été réalisée à partir de 10^6 cellules HEK-293 exprimant de manière transitoire la β -arrestine 1 étiquetée TAP. Sur chaque piste a été déposée un aliquot comme suit :

- | | |
|--|---|
| 1 : lysat initial (10% du lysat total) | 5 : fraction non retenue sur billes calmoduline (10%) |
| 2 : fraction non retenue sur billes d'IgG (10%) | 6 : éluat final EGTA (total) |
| 3 : éluat après traitement protéolytique TEV (10%) | 7 : billes calmoduline après élution (total) |
| 4 : billes d'IgG-agarose après élution (total) | |

Ces essais préliminaires ont validé l'efficacité de l'étiquette TAP placée en position C-terminale pour la purification en deux étapes de la β -arrestine 1. Toutefois, des améliorations ont dû être apportées au protocole de purification. Les quantités de billes recouvertes d'IgG ou de calmoduline utilisées ont été augmentées puisque les fractions non retenues après incubation du lysat avec les billes d'IgG-agarose ou du premier éluat avec les billes de calmoduline comportent encore une quantité non négligeable de protéine étiquetée (Figure 55, piste 2 et 5). L'élution, assurée par le traitement protéolytique avec la protéase TEV, ne présente pas une efficacité optimale puisqu'il reste de la protéine non clivée et de la protéine clivée sur les billes d'IgG-agarose après élution (Figure 55, piste 4). Les conditions de protéolyse (temps, température et quantité de protéase) et de récupération du matériel protéique clivé ont donc été améliorées en conséquence. La dernière étape de purification est accompagnée d'une dégradation de la protéine d'intérêt. En effet, dans les aliquots correspondants aux étapes de fixation et d'élution des billes de calmoduline, apparaissent, en plus de la bande majoritaire à 60 kDa, plusieurs bandes de masses moléculaires inférieures. L'ajout d'inhibiteurs de protéases lors de la deuxième étape de purification a permis de limiter ces phénomènes de dégradation. Enfin, une bande assez intense, révélatrice de la présence d'une quantité importante de β -arrestine sur les billes de calmoduline après élution, est révélée sur la dernière piste. L'efficacité d'élution des billes de calmoduline a été optimisée en conséquence par l'utilisation d'une concentration plus importante d'EGTA.

Le protocole de purification TAP optimisé à partir des observations ci-dessus est décrit dans le paragraphe A/V-2 des Matériels et Méthodes.

III-2 Etablissement des lignées cellulaires stables exprimant les β -arrestines fusionnées à l'étiquette TAP en vue de l'étude protéomique

Le projet initial était de réaliser l'étude protéomique dans le modèle cellulaire HL-60 qui sont des cellules myéloïdes pouvant être différenciées vers un phénotype "neutrophile-like", donc proche du système physiologique.

Les transfections ont été réalisées sur des cellules HL-60 avec les vecteurs pEF-neo- β Arr1-TAP ou pEF-neo(ou bsd)- β Arr1-TAP-IRES-EGFP. Malgré de multiples tentatives de transfection avec ces différents vecteurs, aucun clone obtenu après la sélection antibiotique

n'a présenté d'expression détectable et stable dans le temps de la β -arrestine fusionnée à l'étiquette TAP.

Le projet a donc finalement été réalisé avec des cellules HEK-293. Les vecteurs pN3- β Arr1-TAP ou pN3- β Arr2-TAP ont été transfectés dans les cellules adhérentes HEK-293 par électroporation. L'expression des β -arrestines étiquetées dans les clones résistants à la néomycine a été testée par western blot et immunodétection de chacune des β -arrestines étiquetées dans les lysats cellulaires et après la première étape de la purification TAP (Figure 56). Les lignées **HEK-293- β Arr1(ou2)-TAP** ont montré une expression stable au cours du temps des protéines étiquetées. Le niveau d'expression du transgène n'a pas pu être comparé quantitativement à celle des β -arrestines endogènes. En effet, le signal d'immunodétection de la protéine étiquetée dépend de la reconnaissance par un anticorps spécifique de la β -arrestine, mais il est également amplifié par la reconnaissance de l'épitope ProtA par les anticorps secondaires utilisés.

Afin de pouvoir isoler les complexes formés autour des β -arrestines dans un contexte de cellules activées par les chimioattractants, le récepteur FPRL1 a été exprimé de manière stable dans la lignée cellulaire HEK-293- β Arr2-TAP. L'expression du récepteur en surface a été contrôlée par immunofluorescence avec des anticorps anti-FPRL1 ainsi que par Western blot sur un lysat cellulaire. La fonctionnalité du récepteur a été testée par la capacité d'un peptide agoniste de FPRL1 à induire l'activation des MAP kinases ERK1/2. Ainsi une lignée cellulaire HEK-293 exprimant de manière stable la β -arrestine 2 étiquetée TAP et le récepteur FPRL1 a pu être obtenue. Dans le cas de la lignée exprimant l'isoforme 1 de β -arrestine fusionnée à l'étiquette TAP, malgré plusieurs tentatives, aucun clone exprimant le récepteur FPRL1 n'a pu être obtenu.

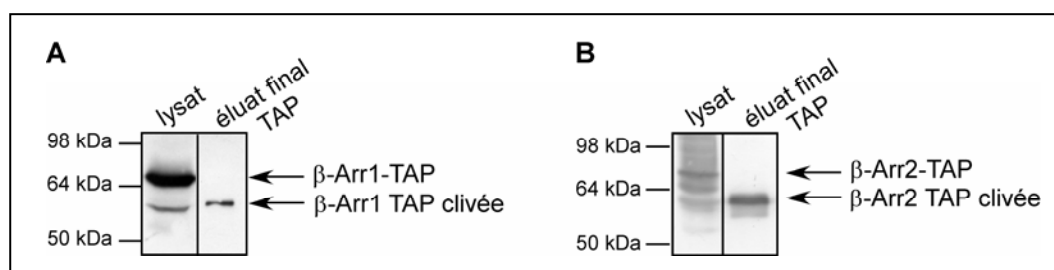


Figure 56 : Expression stable des β -arrestines étiquetées dans le modèle cellulaire HEK-293

Les β -arrestines étiquetées sont détectées par Western blot avec des anticorps commerciaux anti- β -arrestine1(ou 2) dans les lysats cellulaires (10% du total) ou dans les éluats (5%) après la purification TAP à partir des lignées stables HEK-293- β Arr1-TAP (A) ou HEK-293- β Arr2-TAP-FPRL1 (B).

Il a été également vérifié que l'étiquette TAP placée en position C-terminale de la β -arrestine ne perturbait pas l'interaction de la β -arrestine avec le récepteur. Cette interaction peut être révélée par la translocation de la β -arrestine à la membrane. Les quantités de β -arrestine 2 étiquetée ou endogène ont donc été évaluées séparément dans des préparations membranaires issues de cellules HEK-293- β Arr2-TAP-FPRL1 stimulées ou non par un agoniste de FPRL1. La quantification, présentée en Figure 57, a été réalisée après Western blot et immunodétection de la β -arrestine 2. Les formes étiquetées ou endogènes ont pu être différenciées par leurs masses moléculaires (75 et 55 kDa, respectivement). L'augmentation de la quantité de β -arrestine 2 étiquetée TAP présente à la membrane est comparable à celle observée dans le cas de la β -arrestine 2 endogène.

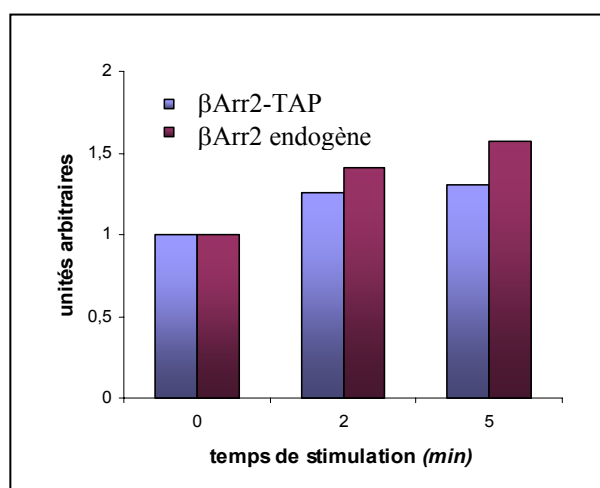


Figure 57 : Translocation des β -arrestines 2 étiquetée ou endogène à la membrane après stimulation

Les cellules HEK-293- β Arr2-TAP-FPRL1 ont été stimulées ou non par 100 nM de peptide WKYMVM. Les lysats cellulaires ont été fractionnés (cf. Matériels et Méthodes, § A/V-3). La quantité de β -arrestine dans la fraction membranaire a été quantifiée à partir d'une immunodétection et rapportée à celle des cellules non stimulées.

III-3 Résultats de l'étude protéomique menée sur les β -arrestines étiquetées TAP

Avant de réaliser l'analyse protéomique, le contenu protéique global de la préparation a été évalué. Une purification à grande échelle a été réalisée à partir de 100×10^6 cellules HEK-293- β Arr1-TAP et les protéines présentes à chacune des étapes ont été révélées après séparation sur gel SDS-PAGE et coloration à l'argent. Comme le montre la Figure 58, la purification est accompagnée d'un enrichissement en une protéine de masse moléculaire

approximative 65 kDa, probablement la protéine appât β -Arr1-TAP. La protéase TEV (27 kDa), qui est un contaminant majeur amené lors de la première élution, est éliminée de façon très efficace lors de la dernière étape de purification.

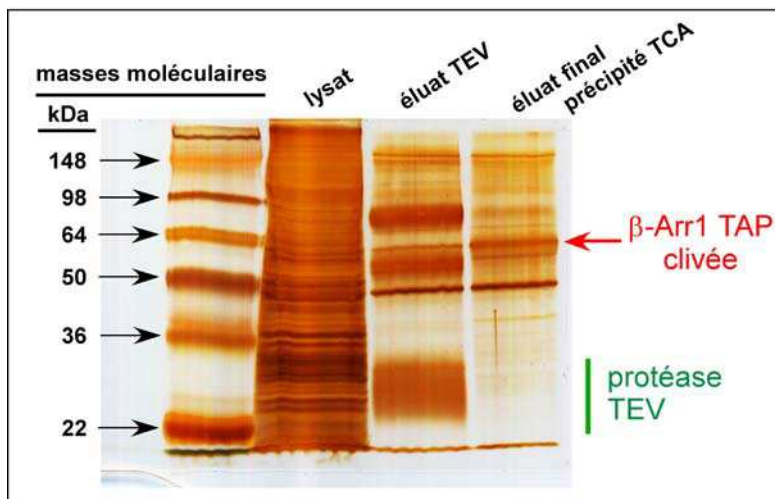


Figure 58 : Contenu protéique des différentes étapes de la purification TAP de la β -arrestine 1 étiquetée TAP dans le clone HEK-293- β Arr1-TAP

La purification a été réalisée à partir 100×10^6 cellules. Seuls 1% du lysat, 2% de l'éluat suite au traitement protéolytique et la totalité de l'éluat final par l'EGTA ont été déposés. Les protéines contenues dans chaque piste ont été révélées par coloration à l'argent.

L'analyse protéomique a été menée par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (nanoLC-ESI-MS/MS), dans le laboratoire d'Etude de la Dynamique des Protéomes (EDyP, iRTSV, CEA Grenoble). Brièvement, les protéines de l'échantillon résultant de la purification sont tout d'abord séparées par une migration d'un centimètre sur gel SDS-PAGE. Des bandes de quelques millimètres de hauteur sont découpées et les protéines qu'elles contiennent sont digérées par la trypsine. Les peptides résultants sont extraits du gel et séparés par nano-chromatographie liquide en phase inverse sur colonne C18 à très faible débit (200 nL/min). En sortie de colonne, une analyse des peptides dans un spectromètre de masse en mode ESI positif (ElectroSpray Ionization) permet de caractériser la masse de ces peptides puis de leurs fragments (d'un ou plusieurs acides aminés) par fragmentation en mode MS/MS. L'ensemble des données de MS/MS est collecté et soumis aux banques de données grâce au moteur de recherche MASCOT. Les résultats obtenus sont triés et validés manuellement avec un outil de tri bioinformatique (IrMa) pour donner en final une liste des protéines présentes dans l'échantillon initial. Ils sont compilés pour chaque analyse sous forme d'un tableau indiquant pour chaque protéine identifiée :

- son identité (nom générique et numéro d'accèsion de type NCBI)
- ses caractéristiques physico-chimiques (point isoélectrique et masse moléculaire)
- sa pertinence dans l'analyse menée (son score "MASCOT", le nombre de peptides détectés et le pourcentage de couverture de la protéine totale par les peptides détectés).

Deux analyses ont été menées sur les cellules HEK-293- β Arr1-TAP ou HEK-293- β Arr2-TAP non activées. Trois autres analyses ont été menées sur les cellules HEK-293- β Arr2-TAP-FPRL1 stimulées par le peptide WKYMVM (100 nM), pendant différents temps d'activation (2, 5 ou 30 minutes). L'ensemble des résultats obtenus est détaillé en annexe A. Les données brutes issues des analyses bioinformatiques comportent en moyenne une cinquantaine de protéines identifiées. Parmi ces protéines, on retrouve en premier lieu, la protéine étiquetée et des contaminants évidents comme la kératine ou la myosine. Parmi les autres protéines, nous avons fait le choix de retenir celles retrouvées le plus fréquemment dans les différentes analyses et qui avaient le meilleur score. Le Tableau 9 et la Figure 59 présentent un récapitulatif de ces protéines et de leurs caractéristiques d'identification (notamment leur score) lors de chaque analyse. Ce type de représentation est basé sur les scores relatifs des protéines et permet de rendre compte des résultats de façon didactique. Il faut cependant garder à l'esprit que, outre la représentativité d'une protéine, sa taille peut influencer sur son score. Le score d'une petite protéine sera, par exemple, sous-évalué car elle ne peut engendrer qu'un nombre restreint de peptides.

Curieusement, le récepteur FPRL1 n'apparaît pas parmi les protéines identifiées dans les complexes formés autour de la β -arrestine 2 lorsque les cellules ont été activées. L'interaction entre le récepteur activé et les β -arrestines est pourtant clairement établie. La méthode de détection des protéines de l'échantillon pourrait ne pas être appropriée au cas particulier de la protéine FPRL1, qui est membranaire. Le récepteur possède en effet sept piliers transmembranaires composés essentiellement d'acides aminés hydrophobes. Les peptides tryptiques résultants de la digestion "in-gel" d'une telle protéine sont donc très hydrophobes, ce qui défavorise leur extraction du gel. Le seul peptide hydrophile qui aurait pu être extrait du gel correspond à la partie C-terminale cytoplasmique de la protéine. Mais ce peptide est d'une longueur importante (27 acides aminés), ce qui rend difficile son extraction du gel et sa fragmentation dans les conditions automatisées de l'analyse.

Protéine accession	β-arrestine 1				β-arrestine 2									
	non activé				non activé				activation					
	essai 1		essai 2		essai 1		essai 2		2 min		5 min		30 min	
	score score relatif	nombre peptides	score score relatif	nombre peptides	score score relatif	nombre peptides	score score relatif	nombre peptides	score score relatif	nombre peptides	score score relatif	nombre peptides	score score relatif	nombre peptides
β-arrestine 1 gi 385885	763 100%	15	842 100%	18										
β-arrestine 2 gi 6978539					1281 100%	22	1052 100%	21	936 100%	18	917 100%	17	1198 100%	21
AP3βA gi 1923268							204 19%	5	472 50%	12	552 60%	12	256 21%	5
Hsp90β gi 72222	100 13%	2	179 21%	4	684 53%	13					125 14%	3		
Hsp70 gi 193983							215 20%	5			333 36%	7	262 22%	6
KAP-1 gi 1699027			402 48%	7	392 31%	7	314 30%	6	182 19%	4	93 10%	3	227 19%	5
AP2β gi 4557469			190 23%	6	93 7%	2	40 4%	2	130 14%	4	78 9%	3		
AP2α gi 27477041			100 12%	2	178 14%	4	155 15%	5	111 12%	3	89 10%	2	87 7%	3
clathrine gi 4758012			94 11%	2	84 7%	2								
dishevelled 2 gi 4758216							211 20%	6					144 12%	4

Tableau 9 : Compilation des résultats des analyses protéomiques menées sur les β-arrestines 1&2 étiquetées TAP

Les principales protéines identifiées lors de l'étude protéomique sont répertoriées par analyse, avec leur score MASCOT et le nombre de peptides détectés. Le score relatif des protéines identifiées est calculé pour chaque analyse par rapport à celui de la protéine étiquetée (βArr1/2-TAP).

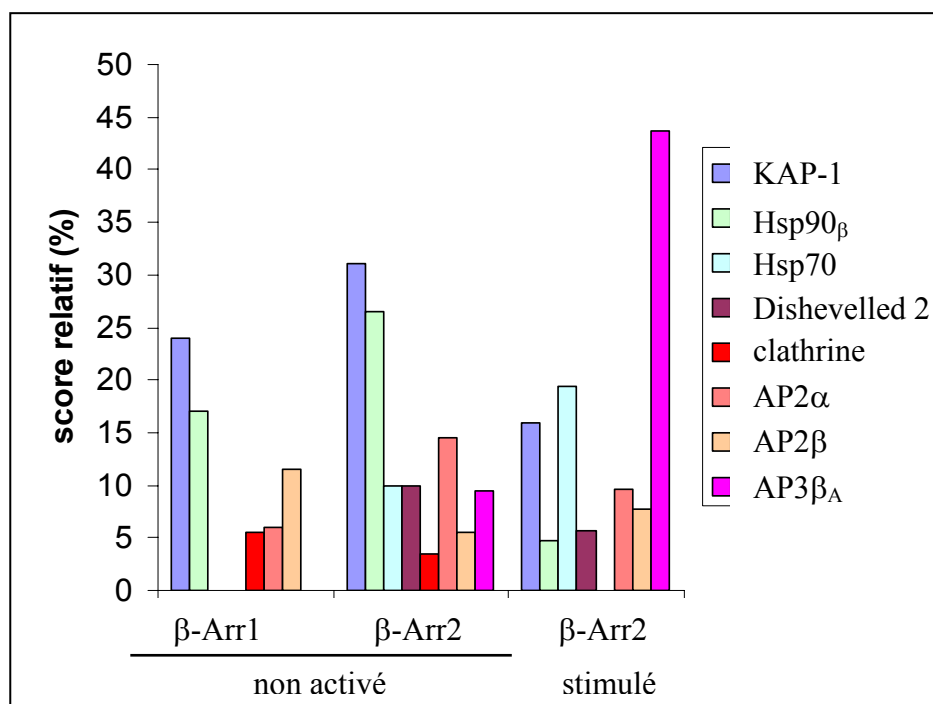


Figure 59 : Représentation graphique des résultats des analyses protéomiques menées sur les complexes formés autour des β -arrestines

Les scores relatifs de chaque protéine ont été moyennés par type d'analyse, c'est-à-dire selon l'isoforme de β -arrestine et l'état de stimulation des cellules. *remarque : une protéine non détectée lors d'une analyse équivaut à un score relatif de 0% pour cette analyse*

La protéine **KAP-1** semble être la protéine la plus constamment retrouvée lors des analyses. Cette protéine est un co-répresseur associé aux domaines KRAB (KRueppel-Associated Box), c'est-à-dire qu'elle intervient dans la répression de la transcription au niveau du noyau (Friedman et al., 1996). Peu d'études ont été réalisées sur le rôle des β -arrestines dans le noyau. La β -arrestine 1 pourrait participer à l'activité transcriptionnelle des cellules en réponse à l'activation des RCPGs. Elle est en effet capable, suite à la stimulation du récepteur δ -opioïde, de recruter certaines histone-acétyltransférases au niveau de sites promoteurs spécifiques, ce qui favorise l'acétylation des histones H4 et la transcription (Kang et al., 2005). Il a été montré que la β -arrestine 2 possède un signal d'export nucléaire qui l'exclut du noyau, et qu'elle participe à la localisation cellulaire d'effecteurs nucléaires comme la Jun kinase 3 (Scott et al., 2002b). Toutefois, cette propriété ne semble pas en adéquation avec un rôle actif de la β -arrestine 2 dans la régulation de la transcription des gènes. En résumé, le fait de retrouver la protéine nucléaire KAP-1 en association avec les β -arrestines dans notre étude pourrait être le signe d'un rôle effectif des β -arrestines dans le noyau, même si cela reste peu probable pour la β -arrestine 2. Une étude plus approfondie sur KAP-1 n'a pas été poursuivie

mais il serait intéressant de lever le doute quant à la pertinence de son interaction avec les β -arrestines.

Les protéines **Hsp 70** et **Hsp 90** (Heat shock protein) sont des protéines chaperones et, à ce titre, elles sont impliquées dans de nombreux mécanismes cellulaires, notamment dans les processus de signalisation et de trafic intracellulaire (pour revue : Pratt et Toft, 2003). Ces deux protéines ont été identifiées dans les échantillons de complexes formés autour des β -arrestines. Quelques essais ont été réalisés pour tenter de mettre en évidence un rôle physiologique de cette interaction présumée entre les β -arrestines et les Hsp 90 et 70. Il existe un inhibiteur spécifique des Hsp 90, la geldanamycine, qui est un antibiotique de la famille des ansamycines (Whitesell et al., 1994). L'influence d'un dérivé de cette drogue sur l'internalisation du récepteur FPRL1 et son interaction avec les β -arrestines a été examinée par immunofluorescence. Aucun effet du traitement avec le 17-AAG (17-(AllylAmino)-17-demethoxyGeldanamycin) n'a pu être détecté.

Les protéines Hsp 70 et Hsp 90 font partie des protéines cellulaires les plus abondantes, Hsp 90 à elle seule représente 1 à 2 % du pool protéique cytosolique. Par ailleurs, la fonction principale de Hsp90 est de stabiliser des protéines de la signalisation mutées ou surexprimées, comme les oncogènes Ras ou Akt (pour revue : Pratt et Toft, 2003). Dans nos expériences, l'éventualité d'un mauvais repliement des β -arrestines étiquetées ne peut être exclue. A ce titre, il se pourrait qu'Hsp 90 interagisse en tant que chaperone avec les β -arrestines étiquetées afin de stabiliser cette protéine exogène. L'abondance et le rôle de chaperone de ces protéines Hsp sont des caractéristiques qui pourraient faire envisager leur présence plutôt comme une contamination de nos échantillons.

Il est connu que la protéine cytosolique **Dishevelled 2** interagit avec les β -arrestines 1 et 2 (Chen et al., 2001). Cette protéine servirait d'intermédiaire dans le recrutement de la β -arrestine 2 par le récepteur Frizzled 4, récepteur qui n'est pas couplé aux protéines G, pour induire son internalisation (Chen et al., 2003b). La protéine Dishevelled 2 a été identifiée lors d'analyses des protéines associées à la β -arrestine 2 en contexte inactivé comme activé. Toutefois, ni les scores assez faibles relatifs à cette interaction (<20%), ni les données de la littérature ne confortent une pertinence de cette interaction dans le cadre de l'activation du récepteur FPRL1.

La chaîne lourde de la **clathrine** a pu être détectée dans les échantillons établis à partir de cellules non activées. Curieusement, son score est assez faible et on ne la retrouve pas associée aux β -arrestines après activation du récepteur. Pourtant, il est clairement établi que les β -arrestines possèdent un site de liaison à la clathrine (domaine LIEF) (Goodman et al., 1996; Krupnick et al., 1997a). Les chaînes lourdes de la clathrine sont des molécules de masse moléculaire importante (1674 acides aminés). De plus, elles sont arrangées sous forme d'homotrimères appelés triskels de clathrine. Il est possible que l'encombrement stérique important de ces triskels associé à l'introduction d'une étiquette sur les β -arrestines ne soit pas favorable au maintien d'une interaction stable entre la clathrine et les β -arrestines étiquetées.

Il est important de noter la présence des sous-unités α et β de la protéine adaptatrice **AP2**, encore appelées adaptines α et β_2 , dans presque tous les échantillons testés. L'interaction entre les β -arrestines et AP2 est connue et est largement étudiée. Elle est primordiale pour le recrutement et l'internalisation des RCPGs dans les puits mantelés de clathrine. Les caractéristiques moléculaires responsables de cette interaction sont d'ores et déjà connus (cf. Introduction, section C/III-2-1). Curieusement, dans les résultats présentés, il semble que le score relatif d'AP2, assimilable à la quantité d'AP2 en interaction avec la β -arrestine, n'évolue pas entre les états non activés et activés des cellules. Une expérience de co-immunoprécipitation a validé cette observation. La quantité d'adaptine β_2 immunoprécipitée avec la β -arrestine 2 fusionnée à l'étiquette TAP ne varie pas entre 0 et 2 minutes de stimulation (Figure 60). Le site d'interaction avec AP2 se situe sur la partie C-terminale des β -arrestines, il est normalement enfoui à l'intérieur de la protéine inactive. Il est possible que l'introduction de l'étiquette TAP en position C-terminale de la β -arrestine induise un changement de conformation qui empêcherait l'enfouissement du bras C-terminal de la β -arrestine et qui rendrait le site d'interaction avec AP2 constamment accessible, même en absence de stimulation. Ceci expliquerait pourquoi la quantité de AP2 en interaction avec la β -arrestine ne varie pas selon l'état de stimulation du récepteur FPRL1.

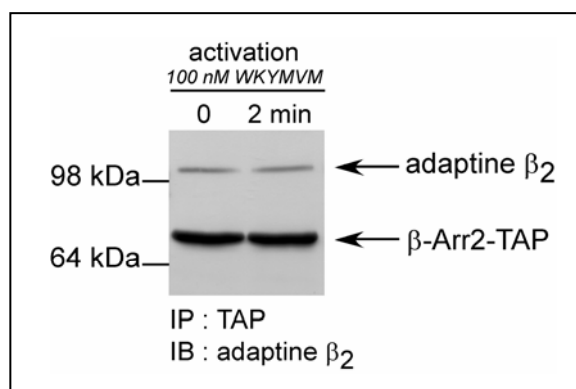


Figure 60 : Co-immunoprécipitation de l'adaptine β_2 par la β -arrestine 2-TAP

Les essais ont été réalisés à partir de lysats de cellules HEK-293- β Arr2-TAP-FPRL1 stimulées ou non avec le peptide WKYMVM (100 nM). La précipitation de la β -arrestine 2-TAP a été réalisée à l'aide de billes IgG et l'immunodétection avec des anticorps anti-adaptine β_2 . *IP* : immunoprécipitation, *IB* : immunoblot

La sous-unité β_{3A} de **AP3** est la protéine dont la représentativité dans les analyses protéomiques menées est la plus remarquable. Cette protéine est en effet quasiment absente des échantillons obtenus à partir de cellules non-activées (une seule identification pour quatre analyses, avec un score relatif inférieur à 20 %), alors qu'elle est retrouvée avec un score relatif moyen de 45 % lors des trois analyses effectuées sur des cellules activées par le peptide WKYMVM, agoniste de FPRL1. AP3 fait partie de la famille des complexes adaptateurs AP impliqués dans le transport vésiculaire. Contrairement à AP2, AP3 n'est pas connu comme partenaire des β -arrestines. Des expériences de pull-down à partir de domaines des sous-unités β des complexes AP fusionnées à la GST (Glutathion S-Transférase) ont mis en évidence une interaction des sous-unités β_1 ou β_2 des protéines adaptatrices AP1 et AP2, mais pas de la sous-unité β_3 de la protéine adaptatrice AP3, avec la β -arrestine 1 (Schmid et al., 2006). Il a toutefois été décidé d'étudier plus précisément l'interaction entre les β -arrestines et la sous-unité β_{3A} de AP3.

III-4 Etude de l'interaction entre les β -arrestines et AP3

III-4-1 Le complexe AP3

La famille des complexes adaptateurs AP comprend les complexes AP1 et AP2, et deux complexes découverts plus récemment, AP3 (Dell'Angelica et al., 1997; Simpson et al., 1996) et AP4 (Dell'Angelica et al., 1999a; Hirst et al., 1999). Ces complexes comprennent quatre

chaînes polypeptidiques appelées adaptines : deux chaînes longues de 100 à 150 kDa (γ/b_1 , a/b_2 , d/b_3 , e/b_4) et deux chaînes courtes de 20 (s_{1-4}) et 50 kDa (m_{1-4}) (pour revue : Kirchhausen, 1999). Ces adaptines sont organisées sous forme de complexes très stables et adoptent une structure en "tête de Mickey" dans laquelle les oreilles sont reliées à la tête par deux liaisons charnières (Figure 61). Une particularité d'AP3 est que ce complexe est présent sous deux formes : l'une ubiquiste ($\delta/\beta_{3A}/\sigma_3/\mu_{3A}$) et l'autre spécifiquement neuronale ($\delta/\beta_{3B}/\sigma_3/\mu_{3B}$).

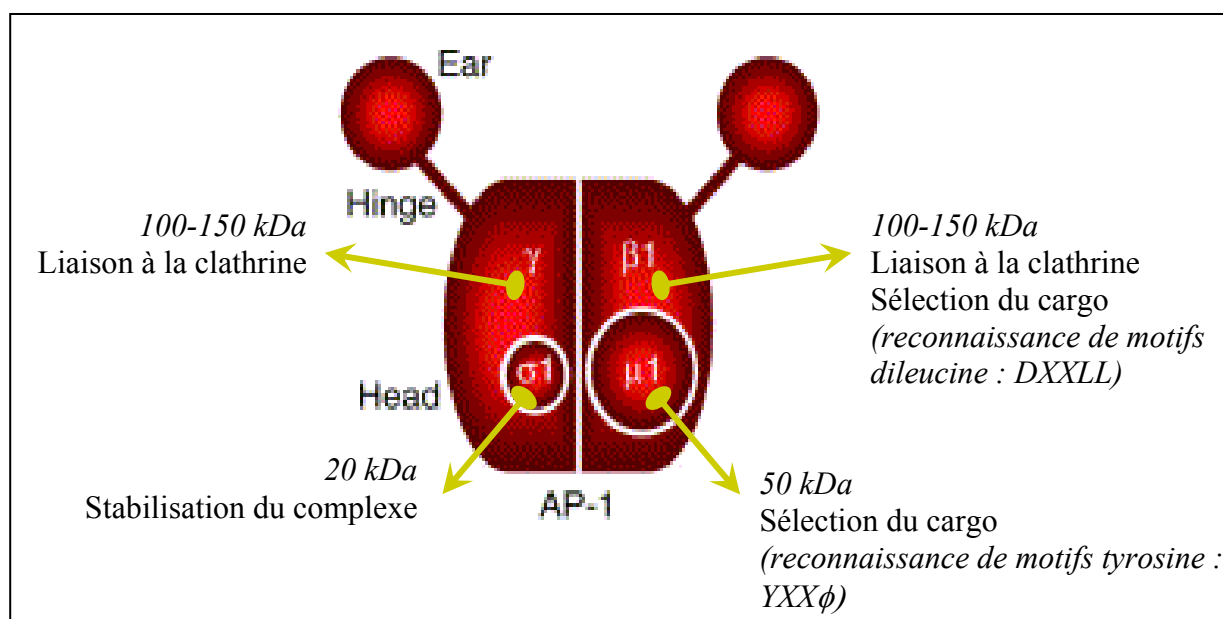


Figure 61 : Schématisation de la structure des complexes AP, exemple de AP1

(adaptée de Robinson et Bonifacino, 2001)

Ces complexes ont une organisation structurale conservée mais des distributions et des rôles intracellulaires différents. Alors que les complexes AP1 et AP2 sont clairement impliqués, respectivement, dans le tri des molécules dans le réseau trans-golgien et dans l'endocytose au niveau de la membrane plasmique, les rôles exacts des complexes AP3 et AP4 sont encore peu connus.

III-4-2 Validation et discussions des résultats de protéomique concernant AP3

Pour valider l'interaction entre les β -arrestines et la sous-unité β_{3A} du complexe AP3, des essais de co-immunoprécipitation ont été réalisés. La protéine β_{3A} endogène ou

surexprimée n'a pas pu être détectée après Western blot et immunodétection avec les anticorps commerciaux dans des lysats cellulaires totaux. L'ADNc codant la sous-unité β_{3A} a donc été fusionné à une étiquette V5 pour permettre son immunodétection. Les deux isoformes de β -arrestine étiquetées TAP ont été immunoprécipitées sur billes d'IgG-agarose et la co-précipitation de β_{3A} -V5 a été examinée par Western blot et immunodétection par les anticorps anti-V5.

La protéine β_{3A} -V5 est retrouvée dans les échantillons d'immunoprécipitation des β -arrestines-TAP sur billes d'IgG-agarose alors qu'elle n'est pas détectée dans des échantillons préparés de la même manière mais en absence de β -arrestine-TAP (Figure 62A). Cette protéine est donc effectivement en interaction directe avec l'une et l'autre des deux isoformes de β -arrestine étiquetées TAP. Des expériences similaires de co-précipitation ont été menées sur la β -arrestine 2-TAP à partir de cellules stimulées ou non par un agoniste de FPRL1. Il apparaît que la protéine β_{3A} -V5 est co-précipitée avec la β -arrestine 2-TAP de manière plus efficace lorsque le récepteur FPRL1 est activé (Figure 62B). De plus, l'association entre β_{3A} -V5 et la β -arrestine 2-TAP semble être maximale aux temps courts de stimulation puisque la quantité de β_{3A} -V5 co-précipitée est légèrement plus faible après 30 minutes de stimulation qu'à 2 et 5 minutes. Ces observations portent à penser que l'interaction entre β_{3A} -V5 et la β -arrestine 2-TAP est dépendante de la stimulation du récepteur FPRL1.

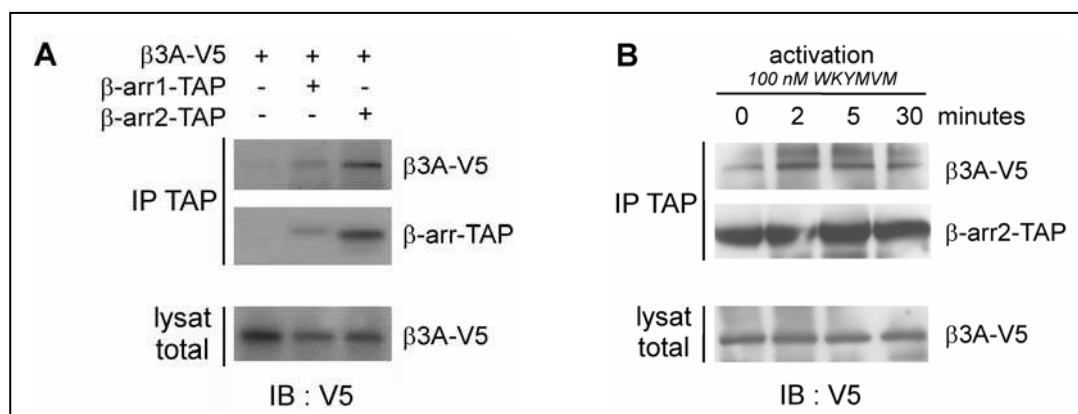


Figure 62 : Caractérisation de l'interaction entre les β -arrestines et la sous-unité β_{3A} du complexe AP3

Les immunodétections ont été réalisées après immunoprécipitation des β -arrestines-TAP avec des billes d'IgG-agarose. *IP* : immunoprécipitation, *IB* : immunodétection

(A) à partir de lysats de cellules HEK-293 exprimant de façon transitoire β_{3A} -V5 et aucune, l'une ou l'autre des isoformes de β -arrestine fusionnée à l'étiquette TAP.

(B) à partir de lysats de cellules HEK-293- β Arr2-TAP-FPRL1 stimulées ou non par le peptide WKYMVM (100 nM).

Pour éliminer un artefact éventuel lié à la présence de l'étiquette TAP, des essais de co-précipitation de la protéine β_{3A} -V5 et des β -arrestines endogènes en utilisant un anticorps anti-V5 ont été réalisés mais se sont révélés infructueux. Les cellules HEK-293 ont donc été co-transfectées avec les plasmides permettant l'expression des protéines β_{3A} -V5 et β -arrestine 1 ou 2 non étiquetée. La co-précipitation soit avec l'anticorps anti-V5, soit avec les anticorps commerciaux anti- β -arrestine 1 ou 2 n'a pas donné de résultats exploitables. Aucune observation n'a donc pu écarter l'hypothèse que l'interaction détectée soit due à la présence de l'étiquette TAP. Toutefois, étant donné que cette interaction semble dépendante de l'activation du récepteur FPRL1, cette hypothèse reste peu probable.

Le site d'interaction entre les β -arrestines et la sous-unité β_2 du complexe AP2 est connu. Il a été identifié dans le domaine C-terminal de la β -arrestine 2 et inclut les résidus arginines 394 et 396 (Laporte et al., 2000). Etant donné que les complexes AP2 et AP3 appartiennent à la même famille, il est possible que ce site soit également requis pour l'interaction avec la sous-unité β_3 du complexe AP3. Les arginines 394 et 396 de la β -arrestine 2-TAP ont donc été remplacées par des alanines par mutagenèse dirigée (cf. Matériels et Méthodes, § B/III-2). L'interaction entre le mutant R^{394,396}A de la β -arrestine 2-TAP et la protéine β_{3A} -V5 a été examinée. Comme précédemment, la β -arrestine 2-TAP (sauvage ou mutée) a été immunoprécipitée sur billes d'IgG-agarose et la co-précipitation de β_{3A} -V5 a été détectée par Western blot. La quantité de protéine β_{3A} -V5 co-précipitée avec la β -arrestine 2-TAP n'est pas modifiée par l'introduction des mutations R^{394,396}A affectant le site de liaison de la β -arrestine 2 avec AP2. L'interaction entre les β -arrestines et AP3 ne semble donc pas reposer sur les mêmes bases moléculaires que celles impliquées dans l'interaction avec AP2.

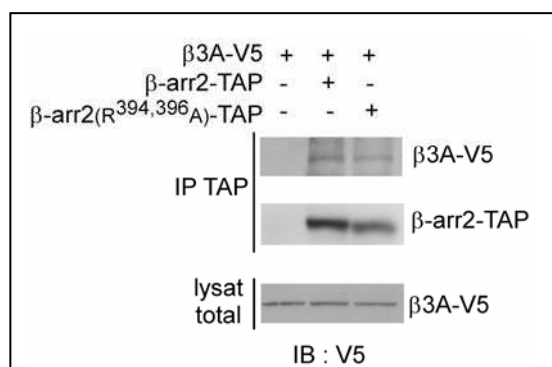


Figure 63 : Effet des mutations R^{394,396}G de la β -arrestine 2 sur son interaction avec AP3

Les immunodétections ont été réalisées après immunoprécipitation de la β -arrestine 2-TAP avec des billes d'IgG-agarose à partir de lysats de cellules HEK-293-FPRL1 stimulées (2 min, 100 nM WKYMVM) et exprimant de façon transitoire β_{3A} -V5 seul ou avec la β -arrestine 2 de type sauvage ou muté fusionnée à l'étiquette TAP. *IP* : immunoprécipitation, *IB* : immunodétection

Les complexes AP1 et AP2 sont connus comme facteurs favorisant l'assemblage des triskèles de clathrine. La propriété du complexe AP3 à agir comme adaptateur de la clathrine a été très controversée. Sa sous-unité μ 3B n'est pas enrichie dans des préparations de CCV (Clathrin Coated Vesicles) issues de cerveaux, au contraire de la γ -adaptine de AP1 (Simpson et al., 1996). Pourtant la chaîne lourde de la clathrine a été identifiée dans une expérience de pull-down à partir du domaine C-terminal de la sous-unité β 3A fusionné à la GST (Dell'Angelica et al., 1998). Récemment, une étude convaincante réalisée par protéomique comparative montre que le complexe adaptateur AP3 (mais pas AP4) est effectivement associé aux CCV issues de cellules HeLa (Borner et al., 2006).

Une série de travaux ont été réalisés à partir de mutations ou de déficiences affectant le complexe AP3 (pour revue : Boehm et Bonifacino, 2002). L'implication du complexe AP3 dans le transport spécifique de molécules cargo vers la vacuole de la levure *S. cerevisiae* (Cowles et al., 1997) est en étroite relation avec des observations faites sur d'autres organismes. Des études sur la drosophile ont montré que AP3 était impliqué dans la biogenèse des granules pigmentaires. Par exemple, le mutant de drosophile *garnet*, dans lequel l'expression de l'orthologue de la sous-unité δ de AP3 est altérée, présente une couleur anormale des yeux due à une réduction du nombre de granules pigmentaires autour des ommatidies (Ooi et al., 1997). Des souches mutantes de l'amibe *Dictyostelium discoïdeum* déficientes en sous-unité μ 3 ont été réalisées (Mercanti et al., 2006). Chez cet organisme modèle utilisé pour l'étude du transport vésiculaire, il a été montré qu'AP3 joue un rôle dans la compartimentation de la voie endocytaire (Charette et al., 2006). La souris *pearl*, dans

laquelle le gène codant la sous-unité $\beta 3A$ comporte des mutations (Feng et al., 1999), montre une hypopigmentation du pelage et des yeux, ainsi que des saignements prolongés dus à des défauts dans la biogenèse des mélanosomes et des granules denses plaquettaires. Ces souris sont un modèle d'étude du syndrome d'Hermansky-Pudlak de type 2. Cette pathologie humaine se traduit par une hypopigmentation, des saignements prolongés et l'absence de certains marqueurs lysosomaux (Dell'Angelica et al., 1999b; Hermansky et Pudlak, 1959). Elle est due à une mutation sur le gène *HPS2* codant la sous-unité $\beta 3A$ du complexe AP3 (Shotelersuk et al., 2000).

L'ensemble de ces observations suggère fortement un rôle d'AP3 dans la formation de vésicules ou le transport vers les organelles comme les granules pigmentaires, les granules denses plaquettaires ou le lysosome. AP3 pourrait donc également jouer un rôle dans le transport des vésicules mantelées de clathrine.

Des travaux complémentaires restent à conduire pour comprendre le rôle de l'interaction entre les β -arrestines et le complexe AP3. A l'exemple d'un travail réalisé dans le groupe de Margaret Robinson sur AP2 (Motley et al., 2003), la technique d'interférence ARN pourrait être utilisée pour inhiber l'expression d'une des sous-unités de AP3. Les complexes AP n'étant actifs que sous forme d'hétérotétramères, ceci suffirait à inhiber l'action du complexe AP3 dans sa globalité et peut-être à faire apparaître un phénotype.

III-5 Discussions et perspectives sur l'étude protéomique menée sur les β -arrestines

L'un des avantages de l'utilisation du système TAP en levure est que la protéine étiquetée est exprimée en remplacement de la protéine endogène et sous son promoteur naturel, ceci grâce aux techniques de recombinaison homologue extrêmement efficace dans ce modèle (Puig et al., 2001). Chez les eucaryotes supérieurs, un artifice a été mis au point afin de se rapprocher de ces conditions. Il s'agit de la méthodologie "iTAP", qui combine la méthode TAP à l'interférence ARN (Forler et al., 2003). Cette méthode consiste simultanément à inhiber l'expression de la protéine endogène avec des ARN interférents et à exprimer, en fusion avec l'étiquette TAP, soit une protéine orthologue, soit la même protéine

comportant des mutations silencieuses au niveau de la séquence ADN reconnue par les ARN interférents.

Quelques publications font état de possibilités d'amélioration de la méthode TAP. Récemment, une étude comparative a été réalisée pour tester de nouvelles étiquettes adaptables à la méthode TAP (Burckstummer et al., 2006). Aussi, il semblerait que les remplacements de la partie Prot A par deux domaines de la protéine G liant les IgGs ainsi que du motif CBP par un peptide liant la streptavidine (StrepTAG) entraînent des rendements de purifications meilleurs que ceux observés avec l'étiquette TAP classique.

Malgré les conditions non dénaturantes utilisées lors de toutes les étapes de la purification TAP, il est possible que certaines interactions de faible affinité soient dissociées. Le formaldéhyde a été utilisé comme agent de réticulation lors d'une purification TAP réalisée à partir de cellules végétales (Rohila et al., 2004). Les résultats issus d'une telle analyse sont à interpréter avec de grandes précautions car, étant donné les limites de détection très faibles du spectromètre de masse, la réticulation amène probablement à l'identification de plus de contaminants que de nouveaux partenaires fonctionnels dans les échantillons analysés.

La calmoduline est une protéine impliquée dans de nombreuses interactions cellulaires et l'hypothèse a parfois été émise que l'utilisation de billes recouvertes de calmoduline lors de la purification pourrait amener des contaminants artefactuels. Toutefois, le fait que la calmoduline intervienne après une première étape de purification limite ce phénomène. Dans le même ordre d'idées, il a récemment été décrit que les β -arrestines peuvent interagir avec la calmoduline (Wu et al., 2006). Cette propriété n'entrave pas la purification qui a été menée puisqu'elle ne pourrait qu'améliorer le rendement de la deuxième étape. Cependant, le site d'interaction des β -arrestines avec la calmoduline semble se chevaucher avec le site de fixation du récepteur sur l'arrestine (Wu et al., 2006). Lors de l'étape de purification sur billes de calmoduline, la calmoduline pourrait donc entrer en compétition avec le récepteur pour la fixation aux β -arrestines. Toutefois, l'affinité de l'ordre du nanomolaire des β -arrestines pour les RCPGs activés fait de la calmoduline un compétiteur inefficace pour la liaison aux β -arrestines ($K_d=7\mu\text{M}$). La calmoduline a été détectée dans nos échantillons, mais il n'a pas été possible d'assigner sa présence à une interaction effective avec la β -arrestine ou à une contamination provenant des billes recouvertes de calmoduline utilisées lors de la dernière étape de purification.

IV- La méthode TAP appliquée au récepteur FPRL1

En dehors des protéines G hétérotrimériques et des β -arrestines, d'autres protéines sont certainement associées au FPRL1. La kinase qui le phosphoryle ou la phosphatase qui le déphosphoryle n'ont, par exemple, pas encore été identifiées. La régulation de FPRL1, comme celle des autres RCPGs, fait intervenir une régulation fine et complexe, en partie assurée par un trafic intracellulaire du récepteur suite à son activation. Les différentes étapes de ce trafic sont l'internalisation par l'intermédiaire des puits mantelés de clathrine dans des vésicules d'endocytose puis le recyclage à la membrane, étapes qui font sans doute intervenir des protéines de transport. C'est pour tenter de définir les partenaires protéiques intervenant dans chaque étape de ce trafic intracellulaire qu'une étude protéomique basée sur le récepteur a été conduite.

IV-1 Etablissement de lignées cellulaires stables exprimant FPRL1-TAP

Le vecteur **pEF-neo-FPRL1-TAP** permet l'expression, sous contrôle du promoteur pEF, du récepteur FPRL1 fusionné en position C-terminale à l'étiquette TAP.

Une lignée cellulaire HL-60 exprimant de manière stable le récepteur FPRL1 étiqueté TAP a été établie. Contrairement au cas des β -arrestines, l'établissement de cette lignée n'a pas été problématique et plusieurs clones expresseurs ont pu être obtenus après transfection des cellules HL-60 avec le vecteur pEF-neo-FPRL1-TAP. Le criblage a été effectué par des tests de mobilisation du calcium intracellulaire en réponse à un ajout du peptide WKYMVm, agoniste spécifique du récepteur FPRL1. Ce mode de criblage présente plusieurs avantages. En plus d'être un indicateur de l'expression, il permet de vérifier si le récepteur exprimé est fonctionnel.

La Figure 64 présente le résultat du test de mobilisation du calcium intracellulaire sur les cellules du clone HL-60-FPRL1-TAP. Ces cellules présentent une concentration basale de calcium intracellulaire proche de 200 nM qui atteint 1150 nM après l'addition du peptide synthétique WKYMVm. Cette valeur est comparable à celle obtenue lors de travaux précédents du groupe pour le récepteur FPRL1 non étiqueté (Christophe et al., 2001). La présence de l'étiquette TAP en C-terminal du récepteur ne perturbe donc pas la transmission du signal.

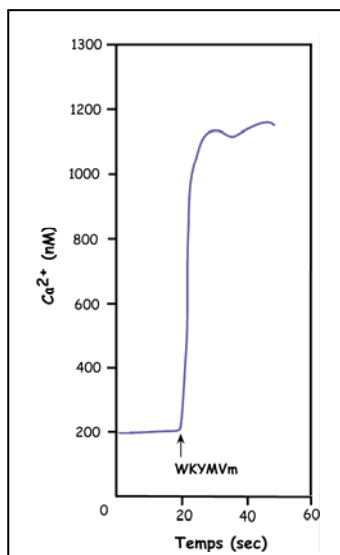


Figure 64 : Mobilisation du calcium intracellulaire dans les cellules HL-60 exprimant le récepteur FPRL1 étiqueté TAP

Etant donné les difficultés prévisibles concernant l'étude protéomique menée à partir de cellules HL-60, qui ne produisent généralement qu'une faible quantité de protéines transgéniques, une lignée cellulaire HEK-293 stable exprimant le récepteur FPRL1 étiqueté TAP a également été établie. La sélection des clones expresseurs a été réalisée par liaison de ligand radioactif (peptide WKYVMm marqué à l'iode ^{125}I).

IV-2 Résultats

IV-2-1 Internalisation du récepteur FPRL1-TAP et interaction avec les β -arrestines

Des travaux préliminaires ont été menés pour vérifier que le trafic du récepteur FPRL1 n'était pas affecté par la présence de l'étiquette TAP placée en position C-terminale. Cette étiquette présente en effet une taille approximative de 20 kDa qui, lorsqu'elle est placée à l'extrémité de la queue cytosolique du récepteur, pourrait entraver les interactions protéiques requises pour son internalisation, notamment l'interaction avec les β -arrestines.

La cinétique d'internalisation du récepteur étiqueté et son interaction concomitante avec les β -arrestines ont été examinées par microscopie de fluorescence. Les cellules HEK293-FPRL1-TAP ont été transfectées de manière transitoire avec le vecteur pEGFP-N3- β Arr1 ou 2. Ces vecteurs permettent l'expression de l'une ou l'autre des β -arrestines fusionnée en

position C-terminale avec l'EGFP. Le récepteur a été visualisé par immuno-marquage à l'aide d'un anticorps polyclonal commercial anti-FPRL1 et d'un anticorps secondaire couplé à l'Alexa 568 qui émet une fluorescence rouge.

Les résultats obtenus pour les deux isoformes de β -arrestine sont très similaires, aussi, seuls les résultats relatifs à l'une des isoformes (en l'occurrence la β -arrestine 2) sont présentés en Figure 65A. En l'absence d'agoniste, FPRL1-TAP est localisé à la surface cellulaire, comme illustré par le marquage fluorescent intense de la membrane plasmique (Figure 65A). La β -arrestine 2 est distribuée uniformément dans le cytoplasme. L'addition du peptide WKYMVM mène rapidement à la formation de petites vésicules intracellulaires contenant le récepteur et à la redistribution de la β -arrestine2-EGFP. L'association de la β -arrestine avec le récepteur étiqueté dans les vésicules d'endocytose est clairement visible dès 5 minutes de stimulation. La couleur jaune après la superposition des images dénote une co-localisation des deux protéines. L'association de la β -arrestine avec le récepteur est prolongée puisque on retrouve la co-localisation des deux protéines à 30 minutes dans de grosses vésicules périnucléaires.

L'internalisation du récepteur FPRL1-TAP et sa co-localisation avec les β -arrestines présentent un profil similaire à ce qui a été observé pour le récepteur FPRL1 non étiqueté (cf. section C/II-1). Ces expériences montrent donc que la présence de l'étiquette n'influe pas sur le trafic intracellulaire du récepteur FPRL1 après stimulation et que la présence de l'étiquette n'inhibe pas l'interaction avec les β -arrestines.

Dans la perspective d'identifier les protéines associées au récepteur FPRL1 aux différentes étapes de son trafic intracellulaire, il était nécessaire d'établir avec précision la nature des différents compartiments d'endocytose du récepteur FPRL1-TAP et la cinétique de son passage dans ces compartiments.

Certaines protéines ont été décrites comme des marqueurs des différents compartiments d'endocytose des récepteurs. Par exemple, la détection de la protéine EEA1 (Early Endosome Antigen 1) identifie les endosomes précoces, la protéine Rab11 les endosomes de recyclage et la protéine LAMP2 les lysosomes. La co-localisation intracellulaire du récepteur FPRL1-TAP avec ces marqueurs a été examinée par immunofluorescence après stimulation des cellules avec le peptide WKYMVm. Le récepteur est visualisé comme précédemment, les marqueurs des endosomes sont révélés par immuno-marquage à l'aide d'anticorps monoclonaux couplés

au FITC ou d'anticorps spécifiques révélés par des IgGs de souris conjuguées à l'Alexa 488. FITC et Alexa 488 émettent une fluorescence verte.

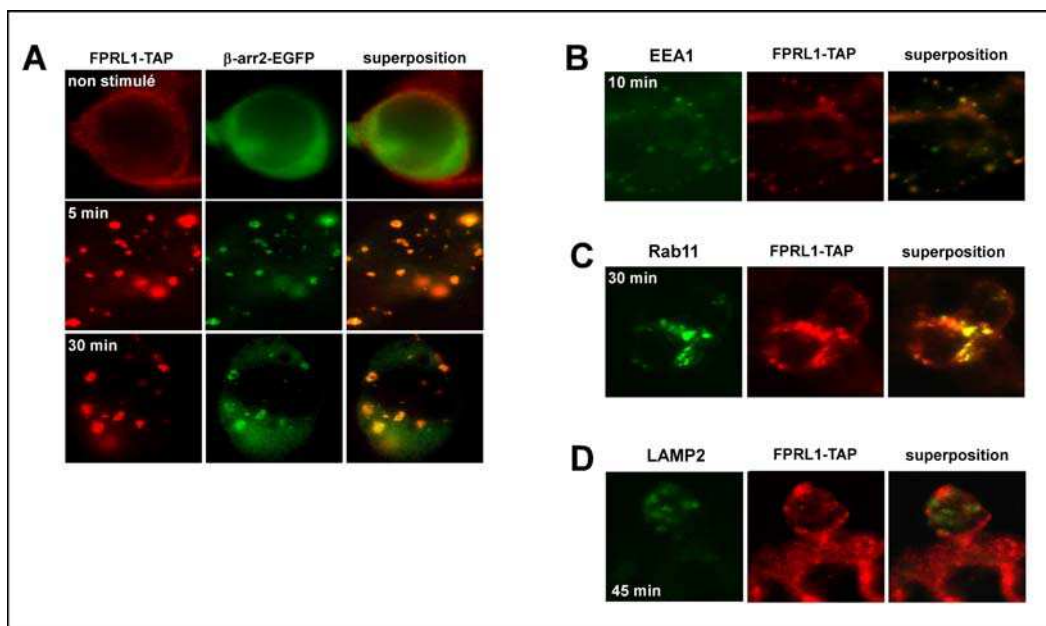


Figure 65 : Images d'immunofluorescence relatives à l'internalisation du récepteur FPRL1-TAP dans les cellules HEK-293

Les cellules HEK-293 exprimant FPRL1-TAP et la protéine hybride β-arrestine 2-EGFP (A), sont cultivées sur des chambres de culture Lab-Tek® et sont activées avec 100 nM de peptide WKYMVM à 37°C. Après stimulation, les cellules sont fixées à la PFA, perméabilisées et marquées avec des anticorps anti-FPRL1 (A) et anti-EEA1 (B), anti-Rab11 (C) ou LAMP2 (D).

Aux temps courts de stimulation, il existe un co-marquage de petites vésicules avec le récepteur et EEA1, marqueur des endosomes précoces (Figure 65B). Aux temps plus longs de stimulation, on observe un co-marquage de grosses vésicules périnucléaires avec le récepteur FPRL1-TAP et Rab11, marqueur des endosomes de recyclage (Figure 65C). Le fait qu'aucun co-marquage de vésicules avec le récepteur et LAMP2 ne soit détectable même après 45 minutes de stimulation (Figure 65D) suggère que FPRL1-TAP n'est pas aiguillé vers les lysosomes. Ce résultat corrobore une étude présentée par l'équipe de Rescher (Ernst et al., 2004) qui montre, sur la base de données d'immunofluorescence, que FPRL1, exprimé dans les cellules Hela, co-localise avec Rab11 après 15 minutes d'activation par le peptide WKYMVM.

IV-2-2 Tentatives d'étude protéomique sur les complexes formés autour du récepteur FPRL1

La purification des complexes formés autour du récepteur FPRL1-TAP a été conduite dans les mêmes conditions que pour la β -arrestine étiquetée TAP, pour laquelle des résultats satisfaisants avaient été obtenus quant à la technique de purification. Il n'a pas été possible de suivre par Western blot la quantité de récepteur au cours des étapes de purification car des immunoglobulines détachées des billes d'IgG-agarose lors de la première colonne d'affinité migrent sur gel SDS-PAGE à la même hauteur que le récepteur étiqueté clivé (~50 kDa) et masquent l'immunodétection de ce dernier.

Pour visualiser uniquement le récepteur, un marquage métabolique des cellules a été réalisé avec de l'acide orthophosphorique ^{32}P . Après stimulation des cellules avec le peptide WKYMVM, le signal de radioactivité correspondant au récepteur phosphorylé a servi d'indicateur de présence du récepteur lors de la purification.

Le résultat de cette analyse est présenté en Figure 66. Après la première étape de purification sur les billes d'IgG-agarose, le récepteur étiqueté peut être visualisé par le marquage d'une bande de forte intensité à 64 kDa (Figure 66, piste 1). Le récepteur FPRL1-TAP phosphorylé est donc bien extrait des membranes, récupéré dans le lysat cellulaire et capable de se fixer aux billes d'IgG-agarose. La diminution de la masse moléculaire du récepteur (Figure 66, piste 2) montre que le clivage par la protéase TEV se fait correctement. Cependant, une quantité non négligeable de récepteur clivé reste associée aux billes d'IgG-agarose (piste 3). De plus, aucune trace du récepteur n'est retrouvée dans l'éluat final (Figure 66, piste 5) ni même sur les billes de calmoduline (Figure 66, piste 4). L'absence de signal radioactif à la seconde étape de purification peut s'expliquer de deux façons :

- soit le récepteur a connu une déphosphorylation durant le processus de purification malgré la présence d'inhibiteurs de phosphatases. Auquel cas, même si il est présent en fin de purification, il ne peut plus être détecté.
- soit il ne parvient pas à se lier aux billes de calmoduline malgré la présence en position C-terminale du peptide liant la calmoduline (CBP), probablement par inaccessibilité conformationnelle.

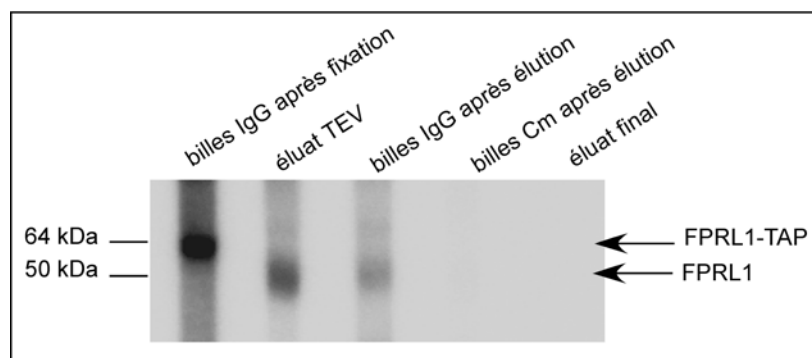


Figure 66 : Purification par affinité en tandem du récepteur FPRL1-TAP exprimé dans les cellules HEK-293 marquées métaboliquement au ^{32}P

Les cellules HEK-293-FPRL1-TAP ont été métaboliquement marquées avec de l'acide orthophosphorique [^{32}P] puis stimulées avec 5 μM du peptide WKYMVM pendant 10 min à 37°C. Après lyse des cellules, la purification en tandem est réalisée en prélevant un échantillon après chaque étape : extraction des billes IgG avant clivage par la TEV (1), surnageant après clivage (2), extraction des billes IgG après clivage (3), extraction des billes calmoduline après élution par l'EGTA (4), éluat EGTA (5). Les échantillons sont analysés par SDS-PAGE et autoradiographie.

Des purifications à grande échelle ont néanmoins été réalisées à partir de cellules HEK-293 ou HL-60 exprimant FPRL1-TAP. Ces analyses protéomiques ont malheureusement confirmé l'absence totale de récepteur et de complexe protéique en fin de purification. La méthode TAP telle qu'elle a été conduite avec succès dans le cadre des β -arrestines-TAP a donc été un échec pour la protéine FPRL1.

IV-3 Perspectives

La purification de protéines membranaires, et d'autant plus la purification de complexes formés autour de protéines membranaires, est un travail ardu. Des travaux ciblés sur la purification des protéines associées aux RCPGs ont déjà été menés, mais jusqu'à récemment, la purification ne pouvait se faire qu'à partir de la partie cytoplasmique du récepteur, sans ses domaines transmembranaires (à l'exemple de Becamel et al., 2002). Pour parvenir à la purification des complexes formés autour du récepteur entier, des améliorations doivent être apportées à la méthode TAP décrite ci-avant.

La nature du détergent est un facteur primordial à la solubilisation des protéines membranaires et serait un élément susceptible d'améliorer les rendements de purification. Lors de la rédaction de ce manuscrit, un article faisant état d'une purification TAP menée avec succès sur des récepteurs couplés aux protéines G (les récepteurs à la mélatonine MT₁ et MT₂) a été publié (Daulat et al., 2007). Dans ce travail, un accent particulier a été placé sur la

nature du détergent utilisé. Le détergent Nonidet P-40, que nous avons utilisé dans nos purifications TAP, semble par exemple inapproprié à la fixation des récepteurs MT_{1&2}-TAP sur les billes d'IgG-agarose. Par contre, l'utilisation de détergents comme la digitonine et le Brij[®]96V a abouti à un rendement de purification satisfaisant pour les récepteurs MT_{1&2}-TAP.

L'ajout d'un bras espaceur de 10 à 20 acides aminés entre l'extrémité C-terminale du récepteur et le motif CBP pourrait rendre la seconde étape de purification efficace, en augmentant l'accessibilité conformationnelle de la partie d'étiquette CBP, si toutefois c'est bien cela qui est en cause dans l'échec de la purification du récepteur FPRL1-TAP.

Comme autre alternative, il est possible d'utiliser une variante de la méthode TAP. Il s'agit de la stratégie du "split-TAG" dans laquelle l'étiquette TAP classique est scindée en deux et portée par deux protéines différentes dont on sait qu'elles font partie du même complexe (Puig et al., 2001). Ainsi, la première étape de purification retiendra l'une des protéines du complexe et la deuxième étape l'autre protéine du même complexe. Au final, cette méthode permet la purification du complexe (Figure 67). Cette technique a été appliquée avec succès à la purification du complexe U2 snRNP (small nuclear RiboNucleoProtein) du spliceosome de *S. cerevisiae*. (Caspary et al., 1999).

Cette méthode présente un autre avantage dans le cadre de l'étude des complexes FPRL1 / β -arrestine puisqu'elle permet de purifier ces complexes en s'affranchissant des complexes formés autour des β -arrestines mais ne comportant pas le récepteur. Ce point est important car, même dans le contexte de cellules activées, il existe au moins deux types de complexes formés autour des protéines β -arrestine 2-TAP : ceux pour lesquels la β -arrestine étiquetée interagit avec le récepteur et ceux comportant la β -arrestine étiquetée mais pas le récepteur.

Le travail concernant l'application de la stratégie du split-TAG au complexe FPRL1 / β -arrestine a d'ors et déjà été initié. Il a été décidé de placer le motif CBP sur la β -arrestine et la partie d'étiquette Tev-ProtA en position C-terminale du récepteur FPRL1. Cette combinaison semble être la plus prometteuse puisque, dans les stratégies précédemment développées, ni l'étape de purification des β -arrestines sur les billes de calmoduline (Figure 55), ni l'étape de purification du récepteur sur les billes d'IgG-agarose (Figure 66) n'ont été problématiques.

Les constructions plasmidiques ont été réalisées (cf. Matériels et Méthodes, § B/III-3) et des lignées HL-60 et HEK-293 exprimant de manière stable la β -arrestine 1 fusionnée au motif CBP et le récepteur FPRL1 fusionné à l'étiquette Tev-ProtA ont été établies. Grâce à ces outils, une nouvelle étude protéomique sera menée prochainement au laboratoire.

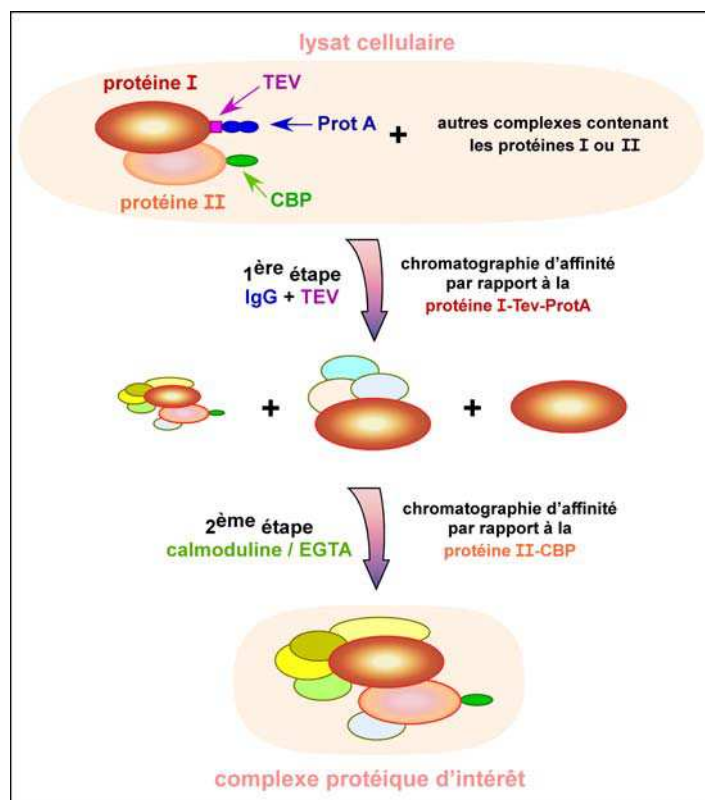


Figure 67 : Schématisation d'une variante de la méthode TAP : le "split-TAG"

DISCUSSION GENERALE

Depuis leur identification et leur clonage, il y a une quinzaine d'années, de nombreuses études ont contribué à la connaissance du rôle biologique, de la signalisation intracellulaire et de la régulation des récepteurs de chimioattractants. Leur rôle pathophysiologique s'étend à présent au-delà de la simple résistance de l'hôte contre les pathogènes.

Les récepteurs de chimioattractants de la famille FPR partagent un fort degré d'identité. Toutefois, des caractères majeurs les différencient et leurs fonctions ne semblent pas être redondantes. Ainsi, à travers l'identification de nouveaux agonistes d'origine bactérienne et la détermination de leurs différentes affinités pour chacun des récepteurs de la famille FPR, il a été montré, notamment durant ce travail, que le récepteur FPR a la faculté d'interagir avec une très forte affinité avec les agonistes dérivés de pathogènes et plus particulièrement les peptides N-formylés. Cette observation suggère que ce récepteur puisse se comporter comme un récepteur de type « pattern recognition receptor » et jouer un rôle important dans la réponse immunitaire innée. Il est d'ailleurs troublant, mais peut-être pas sans pertinence physiologique, que le récepteur FPR échappe au mode de régulation qui s'applique aux autres récepteurs de chimioattractants, et en particulier à son homologue FPRL1 ainsi qu'au récepteur de l'anaphylatoxine C5a. En effet, il a été montré au cours de ce travail que l'internalisation de FPRL1 requiert nécessairement la présence d'au moins une des β -arrestines, alors qu'il avait été montré que le récepteur FPR, pourtant prototype de la famille FPR, s'internalise indépendamment des β -arrestines et par une voie ne faisant pas intervenir les puits mantelés de clathrine. Cette différence majeure dans le mode de régulation de deux récepteurs homologues ne peut être anodine et reflète sans doute des différences plus profondes quant à leur fonction.

FPR et FPRL1, sont maintenant considérés comme des récepteurs de substrats multiples n'exerçant pas de réelle discrimination vis-à-vis de ligands apparemment très différents sur le plan structural. Dans ce travail, il a été démontré pour la première fois que des peptides mitochondriaux humains, donc issus de la dégradation des tissus de l'hôte, étaient des agonistes des récepteurs FPR, FPRL1 et FPRL2. Cette constatation mène à l'hypothèse que les récepteurs de la famille FPR et plus particulièrement le récepteur FPRL1, dont le rôle dans l'amyloïdose et plusieurs maladies neurodégénératives est maintenant bien étayé, pourraient intervenir dans la régulation des processus inflammatoires associés aux dommages et à la dégénération tissulaires. Il semble donc de plus en plus nécessaire de considérer les récepteurs

de chimioattractants comme des cibles potentielles pour la recherche de molécules anti-inflammatoires spécifiques et le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques.

La littérature scientifique récente, qui fait état du rôle des β -arrestines dans la signalisation intracellulaire en aval de nombreux récepteurs couplés aux protéines G, est de plus en plus étoffée. Pourtant, il semblerait que ce rôle soit limité, voire inexistant, dans les voies de signalisation enclenchées par les récepteurs de la famille FPR. Les expériences réalisées lors de ce travail, montrent clairement que la cinétique d'activation des MAP kinases ERK1/2 consécutive à la stimulation du récepteur FPRL1 n'est pas affectée par la surexpression des formes sauvages des deux isoformes de β -arrestine dans le modèle cellulaire HEK-293, ni par leur absence dans les fibroblastes embryonnaires issus de souris déficientes en β -arrestine. De plus, un prétraitement avec la toxine pertussique, un inhibiteur des protéines G hétérotrimériques de type Gi, inhibe la phosphorylation de ERK1/2 résultant de l'activation de FPRL1. Il semblerait donc que, dans le cas du récepteur FPRL1, l'activation des MAPKs soit l'aboutissement d'une voie de signalisation dépendant essentiellement de la protéine G hétérotrimérique. Ces résultats sont confortés par le fait qu'aucune protéine de la signalisation, comme c-Src ou les MAPKs, n'ait été identifiée lors des analyses protéomiques des complexes protéiques formés autour des β -arrestines. Ces conclusions corrélerent avec un travail récent qui montre que l'activation des MAP kinases ERK1/2 suite à la stimulation du récepteur FPR dépend également principalement de la protéine G hétérotrimérique.

Les RCPGs pour lesquels a été décrite une participation des β -arrestines dans la signalisation intracellulaire sont tous des récepteurs couplés à des protéines G hétérotrimériques de type Gq ou Gs. Les récepteurs de chimioattractants ont la particularité d'être couplés à des protéines G hétérotrimériques de type Gi. Le fait que l'activation des MAPKs ERK1/2 consécutive à la stimulation de ces récepteurs se fasse exclusivement par l'intermédiaire de la protéine G hétérotrimérique et ne dépende pas des β -arrestines pourrait donc être une propriété des récepteurs de chimioattractants adaptée à leurs fonctions cellulaires. Pour étayer cette hypothèse, il serait intéressant de mener ce même type d'étude sur les voies de signalisation déclenchées par le C5aR, un autre récepteur de chimioattractants couplé à une protéine G de type Gi.

L'implication des β -arrestines dans la signalisation en aval des RCPGs est associée à leur rôle de protéine d'échafaudage. Dans la plupart des cas étudiés, elles ont aussi pour

fonction de séquestrer les kinases activées pour favoriser l'activation de substrats cytosoliques. Il semblerait au contraire essentiel que les récepteurs de chimioattractants transmettent un signal par les protéines G hétérotrimériques et non par les β -arrestines, afin de ne pas empêcher la translocation des MAPKs vers le noyau où elles jouent un rôle clé dans l'activation des facteurs nucléaires de transcription qui régulent la synthèse d'immunomodulateurs importants de la réponse inflammatoire.

Il apparaît de plus en plus clairement que les β -arrestines se comportent différemment selon le type de récepteur activé, que ce soit en termes d'interaction avec le récepteur qui peut être transitoire ou prolongée, ou de participation aux voies endocytaires et aux voies de signalisation. Il est raisonnable d'émettre l'hypothèse que les β -arrestines peuvent adopter diverses conformations actives plus ou moins favorables à une interaction forte avec le récepteur ou d'autres protéines impliquées dans la signalisation et le trafic intracellulaire. Il en résulterait une manifestation plus ou moins importante de certaines fonctions des β -arrestines. L'ubiquitination des lysines de la β -arrestine 2 semble également participer à la diversité des conformations actives de la protéine. Ainsi, la β -arrestine 2 présenterait un "*code lysine*", spécifique du type de récepteur activé, qui déterminerait le profil de régulation de l'activité de ce type de récepteur.

Cependant, c'est l'interaction du domaine C-terminal phosphorylé avec le corps polaire des β -arrestines qui, au moins en partie, induit le changement de conformation des β -arrestines et leur activation. Lors de ce travail, il a été montré que le récepteur FPRL1 était phosphorylé principalement sur son domaine C-terminal au niveau d'un cluster composé des sérines S³²⁶ et S³²⁹ et de la thréonine T³³². Ce récepteur interagit avec les β -arrestines de façon prolongée au cours de l'endocytose du récepteur et ces dernières sont indispensables à son internalisation, mais les β -arrestines ne participent pas au processus de signalisation intracellulaire. Les domaines C-terminaux des RCPGs sont extrêmement variables dans leur structure globale et dans l'organisation des sites de phosphorylation. Par une vaste étude d'ensemble des RCPGs et du comportement mutuel des β -arrestines et des récepteurs, il serait peut-être possible d'identifier des déterminants consensuels pour le comportement des récepteurs vis-à-vis des β -arrestines ou des β -arrestines vis-à-vis des récepteurs.

Les changements de conformation au niveau de la queue C-terminale et du corps polaire de la β -arrestine, induits par le récepteur, sont également impliqués dans l'interaction de la β -arrestine avec les puits mantelés de clathrine. C'est en effet dans ces zones qu'ont été identifiés les sites de liaison à la clathrine et à la protéine adaptatrice AP2. Il est classiquement admis que les β -arrestines interagissent avec le complexe adaptateur AP2 pour permettre l'internalisation des RCPGs par les puits mantelés de clathrine. Lors de ce travail, AP3, un homologue d'AP2, a été identifié comme nouveau partenaire de la β -arrestine 2. L'interaction est dépendante de l'activation du récepteur FPRL1. Peu de données existent concernant le rôle d'AP3 dans la cellule. Etant donné sa localisation subcellulaire et les pathologies qui lui sont associées, il est suggéré qu'AP3 soit impliqué dans la formation de vésicules ou le transport vers les organelles. Il a été décrit qu'AP3 pourrait être aux vésicules mantelées de clathrine, et il n'est pas exclu qu'il puisse jouer un rôle dans le transport des vésicules par lesquelles transite le récepteur FPRL1 durant son internalisation. L'identification de ce nouveau partenaire des β -arrestines a été faite dans le cadre du développement d'une approche protéomique pour déterminer la composition des complexes formés autour du couple récepteur de chimioattractants / β -arrestine. Cette approche combine une méthode développée pour la purification de complexes protéiques en conditions non dénaturantes (méthode « TAP » pour Tandem Affinity Purification) et la spectrométrie de masse nanoLC-MS/MS suivie d'une analyse bioinformatique. Les résultats encourageants obtenus avec les β -arrestines incitent fortement l'équipe à reconsidérer l'échec de l'application de la méthode de purification au récepteur FPRL1 et à rechercher des alternatives qui permettront l'identification des protéines associées au couple récepteur de chimioattractants / β -arrestine.

BIBLIOGRAPHIE

- Ahn, S., Nelson, C.D., Garrison, T.R., Miller, W.E. and Lefkowitz, R.J. (2003) Desensitization, internalization, and signaling functions of beta-arrestins demonstrated by RNA interference. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **100**, 1740-1744.
- Ahn, S., Shenoy, S.K., Wei, H. and Lefkowitz, R.J. (2004a) Differential kinetic and spatial patterns of beta-arrestin and G protein-mediated ERK activation by the angiotensin II receptor. *J. Biol. Chem.*, **279**, 35518-35525.
- Ahn, S., Wei, H., Garrison, T.R. and Lefkowitz, R.J. (2004b) Reciprocal regulation of angiotensin receptor-activated extracellular signal-regulated kinases by beta-arrestins 1 and 2. *J. Biol. Chem.*, **279**, 7807-7811.
- Attramadal, H., Arriza, J.L., Aoki, C., Dawson, T.M., Codina, J., Kwatra, M.M., Snyder, S.H., Caron, M.G. and Lefkowitz, R.J. (1992) Beta-arrestin2, a novel member of the arrestin/beta-arrestin gene family. *J. Biol. Chem.*, **267**, 17882-17890.
- Babior, B.M. (2004) NADPH oxidase. *Curr. Opin. Immunol.*, **16**, 42-47.
- Bae, Y.S., Lee, H.Y., Jo, E.J., Kim, J.I., Kang, H.K., Ye, R.D., Kwak, J.Y. and Ryu, S.H. (2004) Identification of peptides that antagonize formyl peptide receptor-like 1-mediated signaling. *J. Immunol.*, **173**, 607-614.
- Bae, Y.S., Park, J.C., He, R., Ye, R.D., Kwak, J.Y., Suh, P.G. and Ho Ryu, S. (2003) Differential signaling of formyl peptide receptor-like 1 by Trp-Lys-Tyr-Met-Val-Met-CONH₂ or lipoxin A4 in human neutrophils. *Mol. Pharmacol.*, **64**, 721-730.
- Baek, S.H., Seo, J.K., Chae, C.B., Suh, P.G. and Ryu, S.H. (1996) Identification of the peptides that stimulate the phosphoinositide hydrolysis in lymphocyte cell lines from peptide libraries. *J. Biol. Chem.*, **271**, 8170-8175.
- Bai, M. (2004) Dimerization of G-protein-coupled receptors: roles in signal transduction. *Cell Signal.*, **16**, 175-186.
- Bao, L., Gerard, N.P., Eddy, R.L., Jr., Shows, T.B. and Gerard, C. (1992) Mapping of genes for the human C5a receptor (C5AR), human FMLP receptor (FPR), and two FMLP receptor homologue orphan receptors (FPRH1, FPRH2) to chromosome 19. *Genomics*, **13**, 437-440.
- Barak, L.S., Ferguson, S.S., Zhang, J. and Caron, M.G. (1997) A beta-arrestin/green fluorescent protein biosensor for detecting G protein-coupled receptor activation. *J. Biol. Chem.*, **272**, 27497-27500.
- Beaulieu, J.M., Sotnikova, T.D., Marion, S., Lefkowitz, R.J., Gainetdinov, R.R. and Caron, M.G. (2005) An Akt/beta-arrestin 2/PP2A signaling complex mediates dopaminergic neurotransmission and behavior. *Cell*, **122**, 261-273.
- Becamel, C., Alonso, G., Galeotti, N., Demey, E., Jouin, P., Ullmer, C., Dumuis, A., Bockaert, J. and Marin, P. (2002) Synaptic multiprotein complexes associated with 5-HT(2C) receptors: a proteomic approach. *EMBO J.*, **21**, 2332-2342.
- Bennett, T.A., Foutz, T.D., Gurevich, V.V., Sklar, L.A. and Prossnitz, E.R. (2001) Partial phosphorylation of the N-formyl peptide receptor inhibits G protein association independent of arrestin binding. *J. Biol. Chem.*, **276**, 49195-49203.
- Bennett, T.A., Maestas, D.C. and Prossnitz, E.R. (2000) Arrestin binding to the G protein-coupled N-formyl peptide receptor is regulated by the conserved "DRY" sequence. *J. Biol. Chem.*, **275**, 24590-24594.

- Benovic, J.L., Kuhn, H., Weyand, I., Codina, J., Caron, M.G. and Lefkowitz, R.J. (1987) Functional desensitization of the isolated beta-adrenergic receptor by the beta-adrenergic receptor kinase: potential role of an analog of the retinal protein arrestin (48-kDa protein). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **84**, 8879-8882.
- Benzinger, A., Muster, N., Koch, H.B., Yates, J.R., 3rd and Hermeking, H. (2005) Targeted proteomic analysis of 14-3-3 sigma, a p53 effector commonly silenced in cancer. *Mol. Cell. Proteomics*, **4**, 785-795.
- Betten, A., Bylund, J., Christophe, T., Boulay, F., Romero, A., Hellstrand, K. and Dahlgren, C. (2001) A proinflammatory peptide from *Helicobacter pylori* activates monocytes to induce lymphocyte dysfunction and apoptosis. *J. Clin. Invest.*, **108**, 1221-1228.
- Bockaert, J., Claeysen, S., Becamel, C., Pinloche, S. and Dumuis, A. (2002) G protein-coupled receptors: dominant players in cell-cell communication. *Int. Rev. Cytol.*, **212**, 63-132.
- Boehm, M. and Bonifacino, J.S. (2002) Genetic analyses of adaptin function from yeast to mammals. *Gene*, **286**, 175-186.
- Bohn, L.M., Lefkowitz, R.J., Gainetdinov, R.R., Peppel, K., Caron, M.G. and Lin, F.T. (1999) Enhanced morphine analgesia in mice lacking beta-arrestin 2. *Science*, **286**, 2495-2498.
- Bokoch, G.M. (1995) Chemoattractant signaling and leukocyte activation. *Blood*, **86**, 1649-1660.
- Bommakanti, R.K., Dratz, E.A., Siemsen, D.W. and Jesaitis, A.J. (1995) Extensive contact between Gi2 and N-formyl peptide receptor of human neutrophils: mapping of binding sites using receptor-mimetic peptides. *Biochemistry*, **34**, 6720-6728.
- Borner, G.H., Harbour, M., Hester, S., Lilley, K.S. and Robinson, M.S. (2006) Comparative proteomics of clathrin-coated vesicles. *J. Cell Biol.*, **175**, 571-578.
- Boulay, F., Tardif, M., Brouchon, L. and Vignais, P. (1990a) The human N-formylpeptide receptor. Characterization of two cDNA isolates and evidence for a new subfamily of G-protein-coupled receptors. *Biochemistry*, **29**, 11123-11133.
- Boulay, F., Tardif, M., Brouchon, L. and Vignais, P. (1990b) Synthesis and use of a novel N-formyl peptide derivative to isolate a human N-formyl peptide receptor cDNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **168**, 1103-1109.
- Bouwmeester, T., Bauch, A., Ruffner, H., Angrand, P.O., Bergamini, G., Croughton, K., Cruciat, C., Eberhard, D., Gagneur, J., Ghidelli, S., Hopf, C., Huhse, B., Mangano, R., Michon, A.M., Schirle, M., Schlegl, J., Schwab, M., Stein, M.A., Bauer, A., Casari, G., Drewes, G., Gavin, A.C., Jackson, D.B., Joberty, G., Neubauer, G., Rick, J., Kuster, B. and Superti-Furga, G. (2004) A physical and functional map of the human TNF-alpha/NF-kappa B signal transduction pathway. *Nat. Cell Biol.*, **6**, 97-105.
- Braun, L., Christophe, T. and Boulay, F. (2003) Phosphorylation of key serine residues is required for internalization of the complement 5a (C5a) anaphylatoxin receptor via a beta-arrestin, dynamin, and clathrin-dependent pathway. *J. Biol. Chem.*, **278**, 4277-4285.
- Brummelkamp, T.R., Bernards, R. and Agami, R. (2002) A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science*, **296**, 550-553.

- Burckstummer, T., Bennett, K.L., Preradovic, A., Schutze, G., Hantschel, O., Superti-Furga, G. and Bauch, A. (2006) An efficient tandem affinity purification procedure for interaction proteomics in mammalian cells. *Nat. Methods*, **3**, 1013-1019.
- Bylund, J., Christophe, T., Boulay, F., Nystrom, T., Karlsson, A. and Dahlgren, C. (2001) Proinflammatory activity of a cecropin-like antibacterial peptide from *Helicobacter pylori*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **45**, 1700-1704.
- Bylund, J., Karlsson, A., Boulay, F. and Dahlgren, C. (2002) Lipopolysaccharide-induced granule mobilization and priming of the neutrophil response to *Helicobacter pylori* peptide Hp(2-20), which activates formyl peptide receptor-like 1. *Infect. Immun.*, **70**, 2908-2914.
- Camps, M., Carozzi, A., Schnabel, P., Scheer, A., Parker, P.J. and Gierschik, P. (1992) Isozyme-selective stimulation of phospholipase C-beta 2 by G protein beta gamma-subunits. *Nature*, **360**, 684-686.
- Carp, H. (1982) Mitochondrial N-formylmethionyl proteins as chemoattractants for neutrophils. *J. Exp. Med.*, **155**, 264-275.
- Casparly, F., Shevchenko, A., Wilm, M. and Seraphin, B. (1999) Partial purification of the yeast U2 snRNP reveals a novel yeast pre-mRNA splicing factor required for pre-spliceosome assembly. *EMBO J.*, **18**, 3463-3474.
- Charest, P.G., Terrillon, S. and Bouvier, M. (2005) Monitoring agonist-promoted conformational changes of beta-arrestin in living cells by intramolecular BRET. *EMBO Rep.*, **6**, 334-340.
- Charette, S.J., Mercanti, V., Letourneur, F., Bennett, N. and Cosson, P. (2006) A role for adaptor protein-3 complex in the organization of the endocytic pathway in *Dictyostelium*. *Traffic*, **7**, 1528-1538.
- Chen, W., Hu, L.A., Semenov, M.V., Yanagawa, S., Kikuchi, A., Lefkowitz, R.J. and Miller, W.E. (2001) beta-Arrestin1 modulates lymphoid enhancer factor transcriptional activity through interaction with phosphorylated dishevelled proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **98**, 14889-14894.
- Chen, W., Kirkbride, K.C., How, T., Nelson, C.D., Mo, J., Frederick, J.P., Wang, X.F., Lefkowitz, R.J. and Blobel, G.C. (2003a) Beta-arrestin 2 mediates endocytosis of type III TGF-beta receptor and down-regulation of its signaling. *Science*, **301**, 1394-1397.
- Chen, W., ten Berge, D., Brown, J., Ahn, S., Hu, L.A., Miller, W.E., Caron, M.G., Barak, L.S., Nusse, R. and Lefkowitz, R.J. (2003b) Dishevelled 2 recruits beta-arrestin 2 to mediate Wnt5A-stimulated endocytosis of Frizzled 4. *Science*, **301**, 1391-1394.
- Christophe, T., Karlsson, A., Dugave, C., Rabiet, M.J., Boulay, F. and Dahlgren, C. (2001) The synthetic peptide Trp-Lys-Tyr-Met-Val-Met-NH₂ specifically activates neutrophils through FPRL1/lipoxin A4 receptors and is an agonist for the orphan monocyte-expressed chemoattractant receptor FPRL2. *J. Biol. Chem.*, **276**, 21585-21593.
- Christophe, T., Karlsson, A., Rabiet, M.J., Boulay, F. and Dahlgren, C. (2002) Phagocyte activation by Trp-Lys-Tyr-Met-Val-Met, acting through FPRL1/LXA4R, is not affected by lipoxin A4. *Scand. J. Immunol.*, **56**, 470-476.
- Christophe, T., Rabiet, M.J., Tardif, M., Milcent, M.D. and Boulay, F. (2000) Human complement 5a (C5a) anaphylatoxin receptor (CD88) phosphorylation sites and their specific role in receptor phosphorylation and attenuation of G protein-mediated

- responses. Desensitization of C5a receptor controls superoxide production but not receptor sequestration in HL-60 cells. *J. Biol. Chem.*, **275**, 1656-1664.
- Claing, A., Chen, W., Miller, W.E., Vitale, N., Moss, J., Premont, R.T. and Lefkowitz, R.J. (2001) beta-Arrestin-mediated ADP-ribosylation factor 6 activation and beta 2-adrenergic receptor endocytosis. *J. Biol. Chem.*, **276**, 42509-42513.
- Conner, D.A., Mathier, M.A., Mortensen, R.M., Christe, M., Vatner, S.F., Seidman, C.E. and Seidman, J.G. (1997) beta-Arrestin1 knockout mice appear normal but demonstrate altered cardiac responses to beta-adrenergic stimulation. *Circ. Res.*, **81**, 1021-1026.
- Cowles, C.R., Odorizzi, G., Payne, G.S. and Emr, S.D. (1997) The AP-3 adaptor complex is essential for cargo-selective transport to the yeast vacuole. *Cell*, **91**, 109-118.
- Cox, D.M., Du, M., Guo, X., Siu, K.W. and McDermott, J.C. (2002) Tandem affinity purification of protein complexes from mammalian cells. *Biotechniques*, **33**, 267-268, 270.
- Craft, C.M., Whitmore, D.H. and Wiechmann, A.F. (1994) Cone arrestin identified by targeting expression of a functional family. *J. Biol. Chem.*, **269**, 4613-4619.
- Cui, Y., Le, Y., Yazawa, H., Gong, W. and Wang, J.M. (2002) Potential role of the formyl peptide receptor-like 1 (FPRL1) in inflammatory aspects of Alzheimer's disease. *J. Leukoc. Biol.*, **72**, 628-635.
- Cunningham, C.C., Vegners, R., Bucki, R., Funaki, M., Korde, N., Hartwig, J.H., Stossel, T.P. and Janmey, P.A. (2001) Cell permeant polyphosphoinositide-binding peptides that block cell motility and actin assembly. *J. Biol. Chem.*, **276**, 43390-43399.
- Dahlgren, C., Christophe, T., Boulay, F., Madianos, P.N., Rabiet, M.J. and Karlsson, A. (2000) The synthetic chemoattractant Trp-Lys-Tyr-Met-Val-DMet activates neutrophils preferentially through the lipoxin A(4) receptor. *Blood*, **95**, 1810-1818.
- Damke, H. (1996) Dynamin and receptor-mediated endocytosis. *FEBS Lett.*, **389**, 48-51.
- Dana, R., Leto, T.L., Malech, H.L. and Levy, R. (1998) Essential requirement of cytosolic phospholipase A2 for activation of the phagocyte NADPH oxidase. *J. Biol. Chem.*, **273**, 441-445.
- Daulat, A.M., Maurice, P., Froment, C., Guillaume, J.L., Broussard, C., Monsarrat, B., Delagrang, P. and Jockers, R. (2007) Purification and identification of G protein-coupled receptor protein complexes under native conditions. *Mol. Cell. Proteomics*.
- de Haas, C.J., Veldkamp, K.E., Peschel, A., Weerkamp, F., Van Wamel, W.J., Heezius, E.C., Poppelier, M.J., Van Kessel, K.P. and van Strijp, J.A. (2004) Chemotaxis inhibitory protein of *Staphylococcus aureus*, a bacterial antiinflammatory agent. *J. Exp. Med.*, **199**, 687-695.
- Defea, K.A. (2007) Stop That Cell! beta-Arrestin-Dependent Chemotaxis: A Tale of Localized Actin Assembly and Receptor Desensitization. *Annu. Rev. Physiol.*, **69**, 535-560.
- DeFea, K.A., Vaughn, Z.D., O'Bryan, E.M., Nishijima, D., Dery, O. and Bunnett, N.W. (2000a) The proliferative and antiapoptotic effects of substance P are facilitated by formation of a beta -arrestin-dependent scaffolding complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **97**, 11086-11091.

- DeFea, K.A., Zalevsky, J., Thoma, M.S., Dery, O., Mullins, R.D. and Bunnett, N.W. (2000b) beta-arrestin-dependent endocytosis of proteinase-activated receptor 2 is required for intracellular targeting of activated ERK1/2. *J. Cell Biol.*, **148**, 1267-1281.
- Dell'Angelica, E.C., Klumperman, J., Stoorvogel, W. and Bonifacino, J.S. (1998) Association of the AP-3 adaptor complex with clathrin. *Science*, **280**, 431-434.
- Dell'Angelica, E.C., Mullins, C. and Bonifacino, J.S. (1999a) AP-4, a novel protein complex related to clathrin adaptors. *J. Biol. Chem.*, **274**, 7278-7285.
- Dell'Angelica, E.C., Ohno, H., Ooi, C.E., Rabinovich, E., Roche, K.W. and Bonifacino, J.S. (1997) AP-3: an adaptor-like protein complex with ubiquitous expression. *EMBO J.*, **16**, 917-928.
- Dell'Angelica, E.C., Shotelersuk, V., Aguilar, R.C., Gahl, W.A. and Bonifacino, J.S. (1999b) Altered trafficking of lysosomal proteins in Hermansky-Pudlak syndrome due to mutations in the beta 3A subunit of the AP-3 adaptor. *Mol. Cell*, **3**, 11-21.
- Dinauer, M.C. (2003) Regulation of neutrophil function by Rac GTPases. *Curr. Opin. Hematol.*, **10**, 8-15.
- Dougherty, W.G., Cary, S.M. and Parks, T.D. (1989) Molecular genetic analysis of a plant virus polyprotein cleavage site: a model. *Virology*, **171**, 356-364.
- Erhlich, Paul, (1900) Croonian Lecture : On Immunity with special Reference to Cell Life, *Proceedings of the royal Society of London*, **66**, 424-448
- Elbashir, S.M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K. and Tuschl, T. (2001) Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature*, **411**, 494-498.
- Ernst, S., Zobiack, N., Boecker, K., Gerke, V. and Rescher, U. (2004) Agonist-induced trafficking of the low-affinity formyl peptide receptor FPRL1. *Cell. Mol. Life Sci.*, **61**, 1684-1692.
- Feng, L., Seymour, A.B., Jiang, S., To, A., Peden, A.A., Novak, E.K., Zhen, L., Rusiniak, M.E., Eicher, E.M., Robinson, M.S., Gorin, M.B. and Swank, R.T. (1999) The beta3A subunit gene (Ap3b1) of the AP-3 adaptor complex is altered in the mouse hypopigmentation mutant pearl, a model for Hermansky-Pudlak syndrome and night blindness. *Hum. Mol. Genet.*, **8**, 323-330.
- Ferguson, S.S., Downey, W.E., 3rd, Colapietro, A.M., Barak, L.S., Menard, L. and Caron, M.G. (1996) Role of beta-arrestin in mediating agonist-promoted G protein-coupled receptor internalization. *Science*, **271**, 363-366.
- Fiore, S., Maddox, J.F., Perez, H.D. and Serhan, C.N. (1994) Identification of a human cDNA encoding a functional high affinity lipoxin A4 receptor. *J. Exp. Med.*, **180**, 253-260.
- Floyd, D.H., Geva, A., Bruinsma, S.P., Overton, M.C., Blumer, K.J. and Baranski, T.J. (2003) C5a receptor oligomerization. II. Fluorescence resonance energy transfer studies of a human G protein-coupled receptor expressed in yeast. *J. Biol. Chem.*, **278**, 35354-35361.
- Fong, A.M., Premont, R.T., Richardson, R.M., Yu, Y.R., Lefkowitz, R.J. and Patel, D.D. (2002) Defective lymphocyte chemotaxis in beta-arrestin2- and GRK6-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **99**, 7478-7483.

- Forler, D., Kocher, T., Rode, M., Gentzel, M., Izaurralde, E. and Wilm, M. (2003) An efficient protein complex purification method for functional proteomics in higher eukaryotes. *Nat. Biotechnol.*, **21**, 89-92.
- Freer, R.J., Day, A.R., Radding, J.A., Schiffmann, E., Aswanikumar, S., Showell, H.J. and Becker, E.L. (1980) Further studies on the structural requirements for synthetic peptide chemoattractants. *Biochemistry*, **19**, 2404-2410.
- Friedman, J.R., Fredericks, W.J., Jensen, D.E., Speicher, D.W., Huang, X.P., Neilson, E.G. and Rauscher, F.J., 3rd. (1996) KAP-1, a novel corepressor for the highly conserved KRAB repression domain. *Genes Dev.*, **10**, 2067-2078.
- Gaidarov, I., Krupnick, J.G., Falck, J.R., Benovic, J.L. and Keen, J.H. (1999) Arrestin function in G protein-coupled receptor endocytosis requires phosphoinositide binding. *EMBO J.*, **18**, 871-881.
- Gao, H., Sun, Y., Wu, Y., Luan, B., Wang, Y., Qu, B. and Pei, G. (2004) Identification of beta-arrestin2 as a G protein-coupled receptor-stimulated regulator of NF-kappaB pathways. *Mol. Cell*, **14**, 303-317.
- Gao, J.L., Lee, E.J. and Murphy, P.M. (1999) Impaired antibacterial host defense in mice lacking the N-formylpeptide receptor. *J. Exp. Med.*, **189**, 657-662.
- Gavard, J. and Gutkind, J.S. (2006) VEGF controls endothelial-cell permeability by promoting the beta-arrestin-dependent endocytosis of VE-cadherin. *Nat. Cell Biol.*, **8**, 1223-1234.
- Gavin, A.C., Bosche, M., Krause, R., Grandi, P., Marzioch, M., Bauer, A., Schultz, J., Rick, J.M., Michon, A.M., Cruciat, C.M., Remor, M., Hofert, C., Schelder, M., Brajenovic, M., Ruffner, H., Merino, A., Klein, K., Hudak, M., Dickson, D., Rudi, T., Gnau, V., Bauch, A., Bastuck, S., Huhse, B., Leutwein, C., Heurtier, M.A., Copley, R.R., Edelmann, A., Querfurth, E., Rybin, V., Drewes, G., Raida, M., Bouwmeester, T., Bork, P., Seraphin, B., Kuster, B., Neubauer, G. and Superti-Furga, G. (2002) Functional organization of the yeast proteome by systematic analysis of protein complexes. *Nature*, **415**, 141-147.
- Giannini, E., Brouchon, L. and Boulay, F. (1995) Identification of the major phosphorylation sites in human C5a anaphylatoxin receptor in vivo. *J. Biol. Chem.*, **270**, 19166-19172.
- Gibson, S.K., Parkes, J.H. and Liebman, P.A. (2000) Phosphorylation modulates the affinity of light-activated rhodopsin for G protein and arrestin. *Biochemistry*, **39**, 5738-5749.
- Gierschik, P., Sidiropoulos, D. and Jakobs, K.H. (1989) Two distinct Gi-proteins mediate formyl peptide receptor signal transduction in human leukemia (HL-60) cells. *J. Biol. Chem.*, **264**, 21470-21473.
- Gilbert, T.L., Bennett, T.A., Maestas, D.C., Cimino, D.F. and Prossnitz, E.R. (2001) Internalization of the human N-formyl peptide and C5a chemoattractant receptors occurs via clathrin-independent mechanisms. *Biochemistry*, **40**, 3467-3475.
- Goldsby, R. A., T. J. Kindt, et al. (2000). *Kuby immunology*. New York, W.H. Freeman.
- Goodman, O.B., Jr., Krupnick, J.G., Gurevich, V.V., Benovic, J.L. and Keen, J.H. (1997) Arrestin/clathrin interaction. Localization of the arrestin binding locus to the clathrin terminal domain. *J. Biol. Chem.*, **272**, 15017-15022.

- Goodman, O.B., Jr., Krupnick, J.G., Santini, F., Gurevich, V.V., Penn, R.B., Gagnon, A.W., Keen, J.H. and Benovic, J.L. (1996) Beta-arrestin acts as a clathrin adaptor in endocytosis of the beta2-adrenergic receptor. *Nature*, **383**, 447-450.
- Gorlach, A., Brandes, R.P., Bassus, S., Kronemann, N., Kirchmaier, C.M., Busse, R. and Schini-Kerth, V.B. (2000) Oxidative stress and expression of p22phox are involved in the up-regulation of tissue factor in vascular smooth muscle cells in response to activated platelets. *Faseb J.*, **14**, 1518-1528.
- Gossen, M. and Bujard, H. (1992) Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **89**, 5547-5551.
- Granzin, J., Wilden, U., Choe, H.W., Labahn, J., Krafft, B. and Buldt, G. (1998) X-ray crystal structure of arrestin from bovine rod outer segments. *Nature*, **391**, 918-921.
- Gripentrog, J.M., Kantele, K.P., Jesaitis, A.J. and Miettinen, H.M. (2003) Experimental evidence for lack of homodimerization of the G protein-coupled human N-formyl peptide receptor. *J. Immunol.*, **171**, 3187-3193.
- Gripentrog, J.M. and Miettinen, H.M. (2005) Activation and nuclear translocation of ERK1/2 by the formyl peptide receptor is regulated by G protein and is not dependent on beta-arrestin translocation or receptor endocytosis. *Cell. Signal.*, **17**, 1300-1311.
- Gulden, P.H., Fischer, P., 3rd, Sherman, N.E., Wang, W., Engelhard, V.H., Shabanowitz, J., Hunt, D.F. and Pamer, E.G. (1996) A *Listeria monocytogenes* pentapeptide is presented to cytolytic T lymphocytes by the H2-M3 MHC class Ib molecule. *Immunity*, **5**, 73-79.
- Gully, D., Moinier, D., Loiseau, L. and Bouveret, E. (2003) New partners of acyl carrier protein detected in *Escherichia coli* by tandem affinity purification. *FEBS Lett.*, **548**, 90-96.
- Han, M., Gurevich, V.V., Vishnivetskiy, S.A., Sigler, P.B. and Schubert, C. (2001) Crystal structure of beta-arrestin at 1.9 Å: possible mechanism of receptor binding and membrane Translocation. *Structure (Camb)*, **9**, 869-880.
- Hannigan, M., Zhan, L., Li, Z., Ai, Y., Wu, D. and Huang, C.K. (2002) Neutrophils lacking phosphoinositide 3-kinase gamma show loss of directionality during N-formyl-Met-Leu-Phe-induced chemotaxis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **99**, 3603-3608.
- Hannon, G.J. (2002) RNA interference. *Nature*, **418**, 244-251.
- Harada, M., Habata, Y., Hosoya, M., Nishi, K., Fujii, R., Kobayashi, M. and Hinuma, S. (2004) N-Formylated humanin activates both formyl peptide receptor-like 1 and 2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **324**, 255-261.
- Hermansky, F. and Pudlak, P. (1959) Albinism associated with hemorrhagic diathesis and unusual pigmented reticular cells in the bone marrow: report of two cases with histochemical studies. *Blood*, **14**, 162-169.
- Hirsch, E., Katanaev, V.L., Garlanda, C., Azzolino, O., Pirola, L., Silengo, L., Sozzani, S., Mantovani, A., Altruda, F. and Wymann, M.P. (2000) Central role for G protein-coupled phosphoinositide 3-kinase gamma in inflammation. *Science*, **287**, 1049-1053.
- Hirsch, J.A., Schubert, C., Gurevich, V.V. and Sigler, P.B. (1999) The 2.8 Å crystal structure of visual arrestin: a model for arrestin's regulation. *Cell*, **97**, 257-269.
- Hirst, J., Bright, N.A., Rous, B. and Robinson, M.S. (1999) Characterization of a fourth adaptor-related protein complex. *Mol. Biol. Cell*, **10**, 2787-2802.

- Huet, E., Boulay, F., Barral S. and Rabiet, M.J. (2007) The role of β -arrestins in the formyl peptide receptor-like 1 internalization and signaling, *Cell. Signal.*, in Press
- Huttenrauch, F., Pollok-Kopp, B. and Oppermann, M. (2005) G protein-coupled receptor kinases promote phosphorylation and beta-arrestin-mediated internalization of CCR5 homo- and hetero-oligomers. *J. Biol. Chem.*, **280**, 37503-37515.
- Iribarren, P., Zhou, Y., Hu, J., Le, Y. and Wang, J.M. (2005) Role of formyl peptide receptor-like 1 (FPRL1/FPR2) in mononuclear phagocyte responses in Alzheimer disease. *Immunol. Res.*, **31**, 165-176.
- Kang, J., Shi, Y., Xiang, B., Qu, B., Su, W., Zhu, M., Zhang, M., Bao, G., Wang, F., Zhang, X., Yang, R., Fan, F., Chen, X., Pei, G. and Ma, L. (2005) A nuclear function of beta-arrestin1 in GPCR signaling: regulation of histone acetylation and gene transcription. *Cell*, **123**, 833-847.
- Kara, E., Crepieux, P., Gauthier, C., Martinat, N., Piketty, V., Guillou, F. and Reiter, E. (2006) A phosphorylation cluster of five serine and threonine residues in the C-terminus of the follicle-stimulating hormone receptor is important for desensitization but not for beta-arrestin-mediated ERK activation. *Mol. Endocrinol.*, **20**, 3014-3026.
- Key, T.A., Foutz, T.D., Gurevich, V.V., Sklar, L.A. and Prossnitz, E.R. (2003) N-formyl peptide receptor phosphorylation domains differentially regulate arrestin and agonist affinity. *J. Biol. Chem.*, **278**, 4041-4047.
- Key, T.A., Vines, C.M., Wagener, B.M., Gurevich, V.V., Sklar, L.A. and Prossnitz, E.R. (2005) Inhibition of chemoattractant N-formyl peptide receptor trafficking by active arrestins. *Traffic*, **6**, 87-99.
- Kim, C., Marchal, C.C., Penninger, J. and Dinanuer, M.C. (2003) The hemopoietic Rho/Rac guanine nucleotide exchange factor Vav1 regulates N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine-activated neutrophil functions. *J. Immunol.*, **171**, 4425-4430.
- Kim, Y.M., Barak, L.S., Caron, M.G. and Benovic, J.L. (2002) Regulation of arrestin-3 phosphorylation by casein kinase II. *J. Biol. Chem.*, **277**, 16837-16846.
- Kirchhausen, T. (1999) Adaptors for clathrin-mediated traffic. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.*, **15**, 705-732.
- Knuesel, M., Wan, Y., Xiao, Z., Holinger, E., Lowe, N., Wang, W. and Liu, X. (2003) Identification of novel protein-protein interactions using a versatile mammalian tandem affinity purification expression system. *Mol. Cell. Proteomics*, **2**, 1225-1233.
- Kohout, T.A., Lin, F.S., Perry, S.J., Conner, D.A. and Lefkowitz, R.J. (2001) beta-Arrestin 1 and 2 differentially regulate heptahelical receptor signaling and trafficking. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **98**, 1601-1606.
- Krupnick, J.G., Goodman, O.B., Jr., Keen, J.H. and Benovic, J.L. (1997a) Arrestin/clathrin interaction. Localization of the clathrin binding domain of nonvisual arrestins to the carboxy terminus. *J. Biol. Chem.*, **272**, 15011-15016.
- Krupnick, J.G., Santini, F., Gagnon, A.W., Keen, J.H. and Benovic, J.L. (1997b) Modulation of the arrestin-clathrin interaction in cells. Characterization of beta-arrestin dominant-negative mutants. *J. Biol. Chem.*, **272**, 32507-32512.
- Kuhn, H. (1978) Light-regulated binding of rhodopsin kinase and other proteins to cattle photoreceptor membranes. *Biochemistry*, **17**, 4389-4395.

- Kuhn, H., Hall, S.W. and Wilden, U. (1984) Light-induced binding of 48-kDa protein to photoreceptor membranes is highly enhanced by phosphorylation of rhodopsin. *FEBS Lett.*, **176**, 473-478.
- Lambeth, J.D. (2004) NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. *Nat. Rev. Immunol.*, **4**, 181-189.
- Laporte, S.A., Miller, W.E., Kim, K.M. and Caron, M.G. (2002) beta-Arrestin/AP-2 interaction in G protein-coupled receptor internalization: identification of a beta-arrestin binding site in beta 2-adaptin. *J. Biol. Chem.*, **277**, 9247-9254.
- Laporte, S.A., Oakley, R.H., Holt, J.A., Barak, L.S. and Caron, M.G. (2000) The interaction of beta-arrestin with the AP-2 adaptor is required for the clustering of beta 2-adrenergic receptor into clathrin-coated pits. *J. Biol. Chem.*, **275**, 23120-23126.
- Laporte, S.A., Oakley, R.H., Zhang, J., Holt, J.A., Ferguson, S.S., Caron, M.G. and Barak, L.S. (1999) The beta2-adrenergic receptor/betaarrestin complex recruits the clathrin adaptor AP-2 during endocytosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **96**, 3712-3717.
- Le, Y., Gong, W., Tiffany, H.L., Tumanov, A., Nedospasov, S., Shen, W., Dunlop, N.M., Gao, J.L., Murphy, P.M., Oppenheim, J.J. and Wang, J.M. (2001) Amyloid (beta)42 activates a G-protein-coupled chemoattractant receptor, FPR-like-1. *J. Neurosci.*, **21**, RC123.
- Lefkowitz, R.J. and Shenoy, S.K. (2005) Transduction of receptor signals by beta-arrestins. *Science*, **308**, 512-517.
- Lenz, L.L., Dere, B. and Bevan, M.J. (1996) Identification of an H2-M3-restricted Listeria epitope: implications for antigen presentation by M3. *Immunity*, **5**, 63-72.
- Lin, F.T., Daaka, Y. and Lefkowitz, R.J. (1998) beta-arrestins regulate mitogenic signaling and clathrin-mediated endocytosis of the insulin-like growth factor I receptor. *J. Biol. Chem.*, **273**, 31640-31643.
- Lin, F.T., Krueger, K.M., Kendall, H.E., Daaka, Y., Fredericks, Z.L., Pitcher, J.A. and Lefkowitz, R.J. (1997) Clathrin-mediated endocytosis of the beta-adrenergic receptor is regulated by phosphorylation/dephosphorylation of beta-arrestin1. *J. Biol. Chem.*, **272**, 31051-31057.
- Lin, F.T., Miller, W.E., Luttrell, L.M. and Lefkowitz, R.J. (1999) Feedback regulation of beta-arrestin1 function by extracellular signal-regulated kinases. *J. Biol. Chem.*, **274**, 15971-15974.
- Lin, L.L., Wartmann, M., Lin, A.Y., Knopf, J.L., Seth, A. and Davis, R.J. (1993) cPLA2 is phosphorylated and activated by MAP kinase. *Cell*, **72**, 269-278.
- Lindahl, K.F., Byers, D.E., Dabhi, V.M., Hovik, R., Jones, E.P., Smith, G.P., Wang, C.R., Xiao, H. and Yoshino, M. (1997) H2-M3, a full-service class Ib histocompatibility antigen. *Annu. Rev. Immunol.*, **15**, 851-879.
- Lohse, M.J., Benovic, J.L., Codina, J., Caron, M.G. and Lefkowitz, R.J. (1990) beta-Arrestin: a protein that regulates beta-adrenergic receptor function. *Science*, **248**, 1547-1550.
- Lopez-Ilasaca, M., Crespo, P., Pellici, P.G., Gutkind, J.S. and Wetzker, R. (1997) Linkage of G protein-coupled receptors to the MAPK signaling pathway through PI 3-kinase gamma. *Science*, **275**, 394-397.
- Luttrell, L.M., Ferguson, S.S., Daaka, Y., Miller, W.E., Maudsley, S., Della Rocca, G.J., Lin, F., Kawakatsu, H., Owada, K., Luttrell, D.K., Caron, M.G. and Lefkowitz, R.J. (1999)

- Beta-arrestin-dependent formation of beta2 adrenergic receptor-Src protein kinase complexes. *Science*, **283**, 655-661.
- Luttrell, L.M., Roudabush, F.L., Choy, E.W., Miller, W.E., Field, M.E., Pierce, K.L. and Lefkowitz, R.J. (2001) Activation and targeting of extracellular signal-regulated kinases by beta-arrestin scaffolds. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **98**, 2449-2454.
- Ma, Y.C., Huang, J., Ali, S., Lowry, W. and Huang, X.Y. (2000) Src tyrosine kinase is a novel direct effector of G proteins. *Cell*, **102**, 635-646.
- Machesky, L.M. and Gould, K.L. (1999) The Arp2/3 complex: a multifunctional actin organizer. *Curr. Opin. Cell. Biol.*, **11**, 117-121.
- Maestes, D.C., Potter, R.M. and Prossnitz, E.R. (1999) Differential phosphorylation paradigms dictate desensitization and internalization of the N-formyl peptide receptor. *J. Biol. Chem.*, **274**, 29791-29795.
- Maniatis, T., Fritsch, E.F. and Sambrook, J. (1982) *Molecular cloning : a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
- Mashukova, A., Spehr, M., Hatt, H. and Neuhaus, E.M. (2006) Beta-arrestin2-mediated internalization of mammalian odorant receptors. *J. Neurosci.*, **26**, 9902-9912.
- McDonald, P.H., Chow, C.W., Miller, W.E., Laporte, S.A., Field, M.E., Lin, F.T., Davis, R.J. and Lefkowitz, R.J. (2000) Beta-arrestin 2: a receptor-regulated MAPK scaffold for the activation of JNK3. *Science*, **290**, 1574-1577.
- Mercanti, V., Charette, S.J., Bennett, N., Ryckewaert, J.J., Letourneur, F. and Cosson, P. (2006) Selective membrane exclusion in phagocytic and macropinocytic cups. *J. Cell Sci.*, **119**, 4079-4087.
- Migeotte, I., Communi, D. and Parmentier, M. (2006) Formyl peptide receptors: a promiscuous subfamily of G protein-coupled receptors controlling immune responses. *Cytokine Growth Factor Rev.*, **17**, 501-519.
- Milano, S.K., Kim, Y.M., Stefano, F.P., Benovic, J.L. and Brenner, C. (2006) Nonvisual arrestin oligomerization and cellular localization are regulated by inositol hexakisphosphate binding. *J. Biol. Chem.*, **281**, 9812-9823.
- Milano, S.K., Pace, H.C., Kim, Y.M., Brenner, C. and Benovic, J.L. (2002) Scaffolding functions of arrestin-2 revealed by crystal structure and mutagenesis. *Biochemistry*, **41**, 3321-3328.
- Miller, W.E., McDonald, P.H., Cai, S.F., Field, M.E., Davis, R.J. and Lefkowitz, R.J. (2001) Identification of a motif in the carboxyl terminus of beta -arrestin2 responsible for activation of JNK3. *J. Biol. Chem.*, **276**, 27770-27777.
- Mills, J.S. (2006) Peptides derived from HIV-1, HIV-2, Ebola virus, SARS coronavirus and coronavirus 229E exhibit high affinity binding to the formyl peptide receptor. *Biochim. Biophys. Acta*, **1762**, 693-703.
- Morel, F., Cohen Tanugi Cholley, L., Brandolin, G., Dianoux, A.C., Martel, C., Champelovier, P., Seigneurin, J.M., Francois, P., Bost, M. and Vignais, P.V. (1993) The O₂- generating oxidase of B lymphocytes: Epstein-Barr virus-immortalized B lymphocytes as a tool for the identification of defective components of the oxidase in chronic granulomatous disease. *Biochim. Biophys. Acta*, **1182**, 101-109.

- Morse, M.C., Bleau, G., Dabhi, V.M., Hetu, F., Drobetsky, E.A., Lindahl, K.F. and Perreault, C. (1996) The COI mitochondrial gene encodes a minor histocompatibility antigen presented by H2-M3. *J. Immunol.*, **156**, 3301-3307.
- Motley, A., Bright, N.A., Seaman, M.N. and Robinson, M.S. (2003) Clathrin-mediated endocytosis in AP-2-depleted cells. *J. Cell Biol.*, **162**, 909-918.
- Mundell, S.J., Luo, J., Benovic, J.L., Conley, P.B. and Poole, A.W. (2006) Distinct clathrin-coated pits sort different G protein-coupled receptor cargo. *Traffic*, **7**, 1420-1431.
- Murakami, A., Yajima, T., Sakuma, H., McLaren, M.J. and Inana, G. (1993) X-arrestin: a new retinal arrestin mapping to the X chromosome. *FEBS Lett.*, **334**, 203-209.
- Murphy, P.M. (1994) The molecular biology of leukocyte chemoattractant receptors. *Annu. Rev. Immunol.*, **12**, 593-633.
- Murphy, P.M., Ozcelik, T., Kenney, R.T., Tiffany, H.L., McDermott, D. and Francke, U. (1992) A structural homologue of the N-formyl peptide receptor. Characterization and chromosome mapping of a peptide chemoattractant receptor family. *J. Biol. Chem.*, **267**, 7637-7643.
- Naik, N., Giannini, E., Brouchon, L. and Boulay, F. (1997) Internalization and recycling of the C5a anaphylatoxin receptor: evidence that the agonist-mediated internalization is modulated by phosphorylation of the C-terminal domain. *J. Cell Sci.*, **110** (Pt 19), 2381-2390.
- Nijhuis, E., Lammers, J.W., Koenderman, L. and Coffey, P.J. (2002) Src kinases regulate PKB activation and modulate cytokine and chemoattractant-controlled neutrophil functioning. *J. Leukoc. Biol.*, **71**, 115-124.
- Oakley, R.H., Laporte, S.A., Holt, J.A., Barak, L.S. and Caron, M.G. (1999) Association of beta-arrestin with G protein-coupled receptors during clathrin-mediated endocytosis dictates the profile of receptor resensitization. *J. Biol. Chem.*, **274**, 32248-32257.
- Oakley, R.H., Laporte, S.A., Holt, J.A., Barak, L.S. and Caron, M.G. (2001) Molecular determinants underlying the formation of stable intracellular G protein-coupled receptor-beta-arrestin complexes after receptor endocytosis*. *J. Biol. Chem.*, **276**, 19452-19460.
- Oakley, R.H., Laporte, S.A., Holt, J.A., Caron, M.G. and Barak, L.S. (2000) Differential affinities of visual arrestin, beta arrestin1, and beta arrestin2 for G protein-coupled receptors delineate two major classes of receptors. *J. Biol. Chem.*, **275**, 17201-17210.
- Okada, T., Le Trong, I., Fox, B.A., Behnke, C.A., Stenkamp, R.E. and Palczewski, K. (2000) X-Ray diffraction analysis of three-dimensional crystals of bovine rhodopsin obtained from mixed micelles. *J. Struct. Biol.*, **130**, 73-80.
- Oliveira, L., Paiva, A.C., Sander, C. and Vriend, G. (1994) A common step for signal transduction in G protein-coupled receptors. *Trends Pharmacol. Sci.*, **15**, 170-172.
- Onorato, J.J., Palczewski, K., Regan, J.W., Caron, M.G., Lefkowitz, R.J. and Benovic, J.L. (1991) Role of acidic amino acids in peptide substrates of the beta-adrenergic receptor kinase and rhodopsin kinase. *Biochemistry*, **30**, 5118-5125.
- Ooi, C.E., Moreira, J.E., Dell'Angelica, E.C., Poy, G., Wassarman, D.A. and Bonifacino, J.S. (1997) Altered expression of a novel adaptin leads to defective pigment granule biogenesis in the Drosophila eye color mutant garnet. *EMBO J.*, **16**, 4508-4518.

- Orsini, M.J. and Benovic, J.L. (1998) Characterization of dominant negative arrestins that inhibit beta2-adrenergic receptor internalization by distinct mechanisms. *J. Biol. Chem.*, **273**, 34616-34622.
- Pamer, E.G., Wang, C.R., Flaherty, L., Lindahl, K.F. and Bevan, M.J. (1992) H-2M3 presents a *Listeria monocytogenes* peptide to cytotoxic T lymphocytes. *Cell*, **70**, 215-223.
- Park, P.S., Filipek, S., Wells, J.W. and Palczewski, K. (2004) Oligomerization of G protein-coupled receptors: past, present, and future. *Biochemistry*, **43**, 15643-15656.
- Parruti, G., Peracchia, F., Sallese, M., Ambrosini, G., Masini, M., Rotilio, D. and De Blasi, A. (1993) Molecular analysis of human beta-arrestin-1: cloning, tissue distribution, and regulation of expression. Identification of two isoforms generated by alternative splicing. *J. Biol. Chem.*, **268**, 9753-9761.
- Pawson, T. and Scott, J.D. (1997) Signaling through scaffold, anchoring, and adaptor proteins. *Science*, **278**, 2075-2080.
- Perroy, J., Pontier, S., Charest, P.G., Aubry, M. and Bouvier, M. (2004) Real-time monitoring of ubiquitination in living cells by BRET. *Nat. Methods*, **1**, 203-208.
- Piketty, V., Kara, E., Guillou, F., Reiter, E. and Crepieux, P. (2006) Follicle-stimulating hormone (FSH) activates extracellular signal-regulated kinase phosphorylation independently of beta-arrestin- and dynamin-mediated FSH receptor internalization. *Reprod. Biol. Endocrinol.*, **4**, 33.
- Potter, R.M., Maestas, D.C., Cimino, D.F. and Prossnitz, E.R. (2006) Regulation of N-formyl peptide receptor signaling and trafficking by individual carboxyl-terminal serine and threonine residues. *J. Immunol.*, **176**, 5418-5425.
- Povsic, T.J., Kohout, T.A. and Lefkowitz, R.J. (2003) Beta-arrestin1 mediates insulin-like growth factor 1 (IGF-1) activation of phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) and anti-apoptosis. *J. Biol. Chem.*, **278**, 51334-51339.
- Prat, C., Bestebroer, J., de Haas, C.J., van Strijp, J.A. and van Kessel, K.P. (2006) A new staphylococcal anti-inflammatory protein that antagonizes the formyl peptide receptor-like 1. *J. Immunol.*, **177**, 8017-8026.
- Pratt, W.B. and Toft, D.O. (2003) Regulation of signaling protein function and trafficking by the hsp90/hsp70-based chaperone machinery. *Exp. Biol. Med.*, **228**, 111-133.
- Princiotta, M.F., Lenz, L.L., Bevan, M.J. and Staerz, U.D. (1998) H2-M3 restricted presentation of a *Listeria*-derived leader peptide. *J. Exp. Med.*, **187**, 1711-1719.
- Prossnitz, E.R., Kim, C.M., Benovic, J.L. and Ye, R.D. (1995) Phosphorylation of the N-formyl peptide receptor carboxyl terminus by the G protein-coupled receptor kinase, GRK2. *J. Biol. Chem.*, **270**, 1130-1137.
- Puig, O., Caspary, F., Rigaut, G., Rutz, B., Bouveret, E., Bragado-Nilsson, E., Wilm, M. and Seraphin, B. (2001) The tandem affinity purification (TAP) method: a general procedure of protein complex purification. *Methods*, **24**, 218-229.
- Quack, I., Rump, L.C., Gerke, P., Walther, I., Vinke, T., Vonend, O., Grunwald, T. and Sellin, L. (2006) beta-Arrestin2 mediates nephrin endocytosis and impairs slit diaphragm integrity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **103**, 14110-14115.
- Rabiet, M.J., Huet, E. and Boulay, F. (2005) Human mitochondria-derived N-formylated peptides are novel agonists equally active on FPR and FPRL1, while *Listeria*

- monocytogenes-derived peptides preferentially activate FPR. *Eur. J. Immunol.*, **35**, 2486-2495.
- Rabiet, M.J., Huet, E. and Boulay, F. (2007) The N-formyl peptide receptors and the anaphylatoxin C5a receptors : an overview. *Biochimie*, In Press
- Rabiet, M.J., Tardif, M., Braun, L. and Boulay, F. (2002) Inhibitory effects of a dominant-interfering form of the Rho-GTPase Cdc42 in the chemoattractant-elicited signaling pathways leading to NADPH oxidase activation in differentiated HL-60 cells. *Blood*, **100**, 1835-1844.
- Radin, J.N., Orihuela, C.J., Murti, G., Guglielmo, C., Murray, P.J. and Tuomanen, E.I. (2005) beta-Arrestin 1 participates in platelet-activating factor receptor-mediated endocytosis of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect. Immun.*, **73**, 7827-7835.
- Rane, M.J., Carrithers, S.L., Arthur, J.M., Klein, J.B. and McLeish, K.R. (1997) Formyl peptide receptors are coupled to multiple mitogen-activated protein kinase cascades by distinct signal transduction pathways: role in activation of reduced nicotinamide adenine dinucleotide oxidase. *J. Immunol.*, **159**, 5070-5078.
- Rapoport, B., Kaufman, K.D. and Chazenbalk, G.D. (1992) Cloning of a member of the arrestin family from a human thyroid cDNA library. *Mol. Cell. Endocrinol.*, **84**, R39-43.
- Revankar, C.M., Vines, C.M., Cimino, D.F. and Prossnitz, E.R. (2004) Arrestins block G protein-coupled receptor-mediated apoptosis. *J. Biol. Chem.*, **279**, 24578-24584.
- Ridley, A.J., Schwartz, M.A., Burridge, K., Firtel, R.A., Ginsberg, M.H., Borisy, G., Parsons, J.T. and Horwitz, A.R. (2003) Cell migration: integrating signals from front to back. *Science*, **302**, 1704-1709.
- Rigaut, G., Shevchenko, A., Rutz, B., Wilm, M., Mann, M. and Seraphin, B. (1999) A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration. *Nat. Biotechnol.*, **17**, 1030-1032.
- Robinson, M.S. and Bonifacino, J.S. (2001) Adaptor-related proteins. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **13**, 444-453.
- Rohila, J.S., Chen, M., Cerny, R. and Fromm, M.E. (2004) Improved tandem affinity purification tag and methods for isolation of protein heterocomplexes from plants. *Plant J.*, **38**, 172-181.
- Rubin, B.B., Downey, G.P., Koh, A., Degousee, N., Ghomashchi, F., Nallan, L., Stefanski, E., Harkin, D.W., Sun, C., Smart, B.P., Lindsay, T.F., Cherepanov, V., Vachon, E., Kelvin, D., Sadilek, M., Brown, G.E., Yaffe, M.B., Plumb, J., Grinstein, S., Glogauer, M. and Gelb, M.H. (2005) Cytosolic phospholipase A2-alpha is necessary for platelet-activating factor biosynthesis, efficient neutrophil-mediated bacterial killing, and the innate immune response to pulmonary infection: cPLA2-alpha does not regulate neutrophil NADPH oxidase activity. *J. Biol. Chem.*, **280**, 7519-7529.
- Sahagun-Ruiz, A., Colla, J.S., Juhn, J., Gao, J.L., Murphy, P.M. and McDermott, D.H. (2001) Contrasting evolution of the human leukocyte N-formylpeptide receptor subtypes FPR and FPRL1R. *Genes Immun.*, **2**, 335-342.
- Sanchez-Madrid, F. and del Pozo, M.A. (1999) Leukocyte polarization in cell migration and immune interactions. *Embo J.*, **18**, 501-511.

- Schmid, E.M., Ford, M.G., Burtey, A., Praefcke, G.J., Peak-Chew, S.Y., Mills, I.G., Benmerah, A. and McMahon, H.T. (2006) Role of the AP2 beta-appendage hub in recruiting partners for clathrin-coated vesicle assembly. *PLoS Biol.*, **4**, e262.
- Scott, M.G., Benmerah, A., Muntaner, O. and Marullo, S. (2002a) Recruitment of activated G protein-coupled receptors to pre-existing clathrin-coated pits in living cells. *J. Biol. Chem.*, **277**, 3552-3559.
- Scott, M.G., Le Rouzic, E., Perianin, A., Pierotti, V., Enslen, H., Benichou, S., Marullo, S. and Benmerah, A. (2002b) Differential nucleocytoplasmic shuttling of beta-arrestins. Characterization of a leucine-rich nuclear export signal in beta-arrestin2. *J. Biol. Chem.*, **277**, 37693-37701.
- Segal, A.W. (2005) How neutrophils kill microbes. *Annu. Rev. Immunol.*, **23**, 197-223.
- Sengelov, H., Boulay, F., Kjeldsen, L. and Borregaard, N. (1994) Subcellular localization and translocation of the receptor for N-formylmethionyl-leucyl-phenylalanine in human neutrophils. *Biochem. J.*, **299** (Pt 2), 473-479.
- Seo, J.K., Choi, S.Y., Kim, Y., Baek, S.H., Kim, K.T., Chae, C.B., Lambeth, J.D., Suh, P.G. and Ryu, S.H. (1997) A peptide with unique receptor specificity: stimulation of phosphoinositide hydrolysis and induction of superoxide generation in human neutrophils. *J. Immunol.*, **158**, 1895-1901.
- Shawar, S.M., Rich, R.R. and Becker, E.L. (1995) Peptides from the amino-terminus of mouse mitochondrially encoded NADH dehydrogenase subunit 1 are potent chemoattractants. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **211**, 812-818.
- Shenoy, S.K. and Lefkowitz, R.J. (2005) Receptor-specific ubiquitination of beta-arrestin directs assembly and targeting of seven-transmembrane receptor signalosomes. *J. Biol. Chem.*, **280**, 15315-15324.
- Shenoy, S.K., McDonald, P.H., Kohout, T.A. and Lefkowitz, R.J. (2001) Regulation of receptor fate by ubiquitination of activated beta 2-adrenergic receptor and beta-arrestin. *Science*, **294**, 1307-1313.
- Shinohara, T., Dietzschold, B., Craft, C.M., Wistow, G., Early, J.J., Donoso, L.A., Horwitz, J. and Tao, R. (1987) Primary and secondary structure of bovine retinal S antigen (48-kDa protein). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **84**, 6975-6979.
- Shotelersuk, V., Dell'Angelica, E.C., Hartnell, L., Bonifacino, J.S. and Gahl, W.A. (2000) A new variant of Hermansky-Pudlak syndrome due to mutations in a gene responsible for vesicle formation. *Am. J. Med.*, **108**, 423-427.
- Showell, H.J., Freer, R.J., Zigmond, S.H., Schiffmann, E., Aswanikumar, S., Corcoran, B. and Becker, E.L. (1976) The structure-activity relations of synthetic peptides as chemotactic factors and inducers of lysosomal secretion for neutrophils. *J. Exp. Med.*, **143**, 1154-1169.
- Simpson, F., Bright, N.A., West, M.A., Newman, L.S., Darnell, R.B. and Robinson, M.S. (1996) A novel adaptor-related protein complex. *J. Cell Biol.*, **133**, 749-760.
- Spiegel, A.M. (1996) Defects in G protein-coupled signal transduction in human disease. *Annu. Rev. Physiol.*, **58**, 143-170.
- Storez, H., Scott, M.G., Issafras, H., Burtey, A., Benmerah, A., Muntaner, O., Piolot, T., Tramier, M., Coppey-Moisan, M., Bouvier, M., Labbe-Jullie, C. and Marullo, S.

- (2005) Homo- and hetero-oligomerization of beta-arrestins in living cells. *J. Biol. Chem.*, **280**, 40210-40215.
- Stoyanov, B., Volinia, S., Hanck, T., Rubio, I., Loubtchenkov, M., Malek, D., Stoyanova, S., Vanhaesebroeck, B., Dhand, R., Nurnberg, B. and et al. (1995) Cloning and characterization of a G protein-activated human phosphoinositide-3 kinase. *Science*, **269**, 690-693.
- Su, S.B., Gong, W., Gao, J.L., Shen, W., Murphy, P.M., Oppenheim, J.J. and Wang, J.M. (1999a) A seven-transmembrane, G protein-coupled receptor, FPRL1, mediates the chemotactic activity of serum amyloid A for human phagocytic cells. *J. Exp. Med.*, **189**, 395-402.
- Su, S.B., Gong, W.H., Gao, J.L., Shen, W.P., Grimm, M.C., Deng, X., Murphy, P.M., Oppenheim, J.J. and Wang, J.M. (1999b) T20/DP178, an ectodomain peptide of human immunodeficiency virus type 1 gp41, is an activator of human phagocyte N-formyl peptide receptor. *Blood*, **93**, 3885-3892.
- Sun, R., Iribarren, P., Zhang, N., Zhou, Y., Gong, W., Cho, E.H., Lockett, S., Chertov, O., Bednar, F., Rogers, T.J., Oppenheim, J.J. and Wang, J.M. (2004) Identification of neutrophil granule protein cathepsin G as a novel chemotactic agonist for the G protein-coupled formyl peptide receptor. *J. Immunol.*, **173**, 428-436.
- Symons, M., Derry, J.M., Karlak, B., Jiang, S., Lemahieu, V., McCormick, F., Francke, U. and Abo, A. (1996) Wiskott-Aldrich syndrome protein, a novel effector for the GTPase CDC42Hs, is implicated in actin polymerization. *Cell*, **84**, 723-734.
- Tardif, M., Brouchon, L., Rabiet, M.J. and Boulay, F. (2003) Direct binding of a fragment of the Wiskott-Aldrich syndrome protein to the C-terminal end of the anaphylatoxin C5a receptor. *Biochem. J.*, **372**, 453-463.
- Tardif, M., Mery, L., Brouchon, L. and Boulay, F. (1993) Agonist-dependent phosphorylation of N-formylpeptide and activation peptide from the fifth component of C (C5a) chemoattractant receptors in differentiated HL60 cells. *J. Immunol.*, **150**, 3534-3545.
- Tardif, M., Rabiet, M.J., Christophe, T., Milcent, M.D. and Boulay, F. (1998) Isolation and characterization of a variant HL60 cell line defective in the activation of the NADPH oxidase by phorbol myristate acetate. *J. Immunol.*, **161**, 6885-6895.
- Tohgo, A., Pierce, K.L., Choy, E.W., Lefkowitz, R.J. and Luttrell, L.M. (2002) beta-Arrestin scaffolding of the ERK cascade enhances cytosolic ERK activity but inhibits ERK-mediated transcription following angiotensin AT1a receptor stimulation. *J. Biol. Chem.*, **277**, 9429-9436.
- Torres, M., Hall, F.L. and O'Neill, K. (1993) Stimulation of human neutrophils with formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine induces tyrosine phosphorylation and activation of two distinct mitogen-activated protein-kinases. *J. Immunol.*, **150**, 1563-1577.
- Tsao, L.T. and Wang, J.P. (1997) Translocation of protein kinase C isoforms in rat neutrophils. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **234**, 412-418.
- Tsu, R.C., Lai, H.W., Allen, R.A. and Wong, Y.H. (1995) Differential coupling of the formyl peptide receptor to adenylate cyclase and phospholipase C by the pertussis toxin-insensitive Gz protein. *Biochem. J.*, **309** (Pt 1), 331-339.
- Ushio-Fukai, M. (2006) Localizing NADPH oxidase-derived ROS. *Sci. STKE*, **2006**, re8.

- van Koppen, C.J. and Jakobs, K.H. (2004) Arrestin-independent internalization of G protein-coupled receptors. *Mol. Pharmacol.*, **66**, 365-367.
- Veraksa, A., Bauer, A. and Artavanis-Tsakonas, S. (2005) Analyzing protein complexes in *Drosophila* with tandem affinity purification-mass spectrometry. *Dev. Dyn.*, **232**, 827-834.
- Verhoef, J. and R. Visser, M. (1993) Neutrophil phagocytosis and killing : normal function and microbial invasion. In J.S., A. and Wheeler, J.G. (eds.), *The Neutrophil*, Oxford, pp. 108-137.
- Vignais, P.V. (2002) The superoxide-generating NADPH oxidase: structural aspects and activation mechanism. *Cell. Mol. Life Sci.*, **59**, 1428-1459.
- Vines, C.M., Revankar, C.M., Maestas, D.C., LaRusch, L.L., Cimino, D.F., Kohout, T.A., Lefkowitz, R.J. and Prossnitz, E.R. (2003) N-formyl peptide receptors internalize but do not recycle in the absence of arrestins. *J. Biol. Chem.*, **278**, 41581-41584.
- Wacker, W.B., Donoso, L.A., Kalsow, C.M., Yankeeelov, J.A., Jr. and Organisciak, D.T. (1977) Experimental allergic uveitis. Isolation, characterization, and localization of a soluble uveitopathogenic antigen from bovine retina. *J. Immunol.*, **119**, 1949-1958.
- Weiner, O.D., Servant, G., Welch, M.D., Mitchison, T.J., Sedat, J.W., Bourne, H.R. (1999) Spatial control of actin polymerization during neutrophil chemotaxis. *Nat. Cell Biol.*, **1**, 75-81
- Welch, H.C., Coadwell, W.J., Ellson, C.D., Ferguson, G.J., Andrews, S.R., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Hawkins, P.T. and Stephens, L.R. (2002) P-Rex1, a PtdIns(3,4,5)P3- and Gbetagamma-regulated guanine-nucleotide exchange factor for Rac. *Cell*, **108**, 809-821.
- Wenzel-Seifert, K., Hurt, C.M. and Seifert, R. (1998) High constitutive activity of the human formyl peptide receptor. *J. Biol. Chem.*, **273**, 24181-24189.
- Wenzel-Seifert, K. and Seifert, R. (1993) Cyclosporin H is a potent and selective formyl peptide receptor antagonist. Comparison with N-t-butoxycarbonyl-L-phenylalanyl-L-leucyl-L-phenylalanyl-L-leucyl-L-phenylalanine and cyclosporins A, B, C, D, and E. *J. Immunol.*, **150**, 4591-4599.
- Wenzel-Seifert, K. and Seifert, R. (2003) Functional differences between human formyl peptide receptor isoforms 26, 98, and G6. *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, **367**, 509-515.
- Westermarck, J., Weiss, C., Saffrich, R., Kast, J., Musti, A.M., Wessely, M., Ansorge, W., Seraphin, B., Wilm, M., Valdez, B.C. and Bohmann, D. (2002) The DEXD/H-box RNA helicase RHII/Gu is a co-factor for c-Jun-activated transcription. *EMBO J.*, **21**, 451-460.
- Whitesell, L., Mimnaugh, E.G., De Costa, B., Myers, C.E. and Neckers, L.M. (1994) Inhibition of heat shock protein HSP90-pp60v-src heteroprotein complex formation by benzoquinone ansamycins: essential role for stress proteins in oncogenic transformation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **91**, 8324-8328.
- Wilden, U., Hall, S.W. and Kuhn, H. (1986) Phosphodiesterase activation by photoexcited rhodopsin is quenched when rhodopsin is phosphorylated and binds the intrinsic 48-kDa protein of rod outer segments. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **83**, 1174-1178.

- Willoughby, E.A. and Collins, M.K. (2005) Dynamic interaction between the dual specificity phosphatase MKP7 and the JNK3 scaffold protein beta-arrestin 2. *J. Biol. Chem.*, **280**, 25651-25658.
- Wistow, G.J., Katial, A., Craft, C. and Shinohara, T. (1986) Sequence analysis of bovine retinal S-antigen. Relationships with alpha-transducin and G-proteins. *FEBS Lett.*, **196**, 23-28.
- Witherow, D.S., Garrison, T.R., Miller, W.E. and Lefkowitz, R.J. (2004) beta-Arrestin inhibits NF-kappaB activity by means of its interaction with the NF-kappaB inhibitor IkappaBalpha. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **101**, 8603-8607.
- Wu, N., Hanson, S.M., Francis, D.J., Vishnivetskiy, S.A., Thibonnier, M., Klug, C.S., Shoham, M. and Gurevich, V.V. (2006) Arrestin binding to calmodulin: a direct interaction between two ubiquitous signaling proteins. *J. Mol. Biol.*, **364**, 955-963.
- Xiao, K., Shenoy, S.K., Nobles, K. and Lefkowitz, R.J. (2004) Activation-dependent conformational changes in {beta}-arrestin 2. *J. Biol. Chem.*, **279**, 55744-55753.
- Yang, S., Madyastha, P., Bingel, S., Ries, W. and Key, L. (2001) A new superoxide-generating oxidase in murine osteoclasts. *J. Biol. Chem.*, **276**, 5452-5458.
- Ye, R.D. and Boulay, F. (1997) Structure and function of leukocyte chemoattractant receptors. *Adv. Pharmacol.*, **39**, 221-289.
- Ying, G., Iribarren, P., Zhou, Y., Gong, W., Zhang, N., Yu, Z.X., Le, Y., Cui, Y. and Wang, J.M. (2004) Humanin, a newly identified neuroprotective factor, uses the G protein-coupled formylpeptide receptor-like-1 as a functional receptor. *J. Immunol.*, **172**, 7078-7085.
- Yon, J. and Fried, M. (1989) Precise gene fusion by PCR. *Nucleic Acids Res.*, **17**, 4895.
- Zhang, Y., Syed, R., Uygur, C., Pallos, D., Gorry, M.C., Firatli, E., Cortelli, J.R., VanDyke, T.E., Hart, P.S., Feingold, E. and Hart, T.C. (2003) Evaluation of human leukocyte N-formylpeptide receptor (FPR1) SNPs in aggressive periodontitis patients. *Genes Immun.*, **4**, 22-29.
- Zhen, L., King, A.A., Xiao, Y., Chanock, S.J., Orkin, S.H. and Dinanuer, M.C. (1993) Gene targeting of X chromosome-linked chronic granulomatous disease locus in a human myeloid leukemia cell line and rescue by expression of recombinant gp91phox. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 9832-9836.
- Zuckerman, R. and Cheasty, J.E. (1986) A 48 kDa protein arrests cGMP phosphodiesterase activation in retinal rod disk membranes. *FEBS Lett.*, **207**, 35-41.

ANNEXES

ANNEXE A

**Inhibition sélective et inductible de
l'expression d'une protéine**

Inhibition sélective et inductible de l'expression d'une protéine

Elaboration d'outils pour l'interférence ARN

L'interférence ARN est une technique qui permet d'inhiber l'expression d'une protéine en dégradant spécifiquement son ARN messager au moyen d'un ribonucléotide double brin de petite taille spécifique de cet ARN messager (siRNA). Le phénomène existe naturellement et les siRNA sont produits par le clivage de longs ARN double brin par une ribonucléase de type III (Hannon, 2002). Dans plusieurs organismes (plantes, nématodes, drosophile), on peut supprimer spécifiquement et très efficacement l'expression d'une protéine par l'introduction de longs ARN double brin. Dans les cellules de mammifères, lorsque des ARN double brin de taille supérieure à 30 paires de bases sont introduits directement, ils activent le système de l'interféron et provoquent une inhibition non spécifique de l'expression des gènes et la mort des cellules. Un effet d'interférence spécifique est toutefois possible si on utilise de petits ARN double brin (siRNA) de 19-23 paires de bases portant deux nucléotides protubérants en position 3' de chaque brin (Elbashir et al., 2001). L'interférence ARN peut également être induite grâce à des plasmides permettant l'expression stable de siRNA à la structure en épingle à cheveux, appelés shRNA, sous le contrôle de promoteurs spécifiques de l'ARN polymérase de type III (Brummelkamp et al., 2002).

I- Validation d'un système d'interférence ARN basé sur l'utilisation d'un vecteur adaptable aux cellules HL-60

Le plasmide **pBBsi** développé au laboratoire permet la production de siRNA à la structure en épingle à cheveux. Une cassette de sélection blasticidine placée sous le contrôle du promoteur EF-1 α permet la sélection de clones de cellules HL-60. La séquence correspondant à l'enchaînement "brin sens, boucle de 9 nucléotides et brin antisens" est placée sous le contrôle du promoteur H1RNA spécifiquement reconnu par l'ARN polymérase III. Cette polymérase sert normalement dans les cellules à la transcription d'ARN de petite taille, la transcription s'arrêtant après le deuxième T d'une séquence de 5 T contigus. Son utilisation est donc tout à fait adaptée à la transcription de petits ARN interférents.

Les oligonucléotides complémentaires comprenant les séquences sens-boucle-antisens de la séquence cible sont hybridés par dénaturation par la chaleur et renaturation lente. Le fragment d'ADN double brin résultant est cloné dans le plasmide pBBsI, entre les sites *Bam*HI et *Hind*III. La fixation de la polymérase III sur le promoteur H1RNA permet la transcription de siRNA à structure en épingle à cheveux.

Les cellules HEK-293T ont été cotransfectées de façon transitoire avec les plasmides pBBsi contenant l'ADN codant pour la séquence sens-boucle-antisens du siRNA à tester et le plasmide pEGFP-N3- β Arr1 permettant l'expression de la protéine de fusion fluorescente β Arr1-EGFP. La détection de l'inhibition est faite visuellement sous microscope à fluorescence puis quantifiée par l'immunodétection de la protéine de fusion avec des anticorps anti-EGFP.

Séquence cible	<i>Bam</i> HI	couple d'oligonucléotides	<i>Hind</i> III
βarr1-7/8 442-462	5'-gatc	ccGCCTTCTGCGCGGAGAATTGttcaagagaCAAAATCTCCGCGCAGAAGGcttttggaaa-3' 3'-gggCGGAAGACGCGCCTCTTAAacaggttctctGTTTAAGAGGCGCGTCTTCGaaaacaccttttcga-5'	

Pour chaque séquence cible (représentée en bleu), la position est indiquée sur l'ADNc de la protéine cible. Les oligonucléotides sont hybridés et les fragments double brin résultants sont clonés entre les sites *Bam*HI et *Hind*III du vecteur pBBSi.

Le plasmide pBBsi- β Arr1-7/8 ciblant la séquence 442-462 s'est avéré efficace pour l'inhibition de l'expression de la protéine de fusion β -arrestine 1-EGFP. La figure 2 montre que la transcription de ce siRNA inhibe la production de la protéine de fusion β -arrestine 1-EGFP dans les cellules HEK-293T. On observe en effet que la forte fluorescence des cellules, due à l'expression de la protéine de fusion (figure 2, page c) est hautement réduite en présence du plasmide pBBsi- β arr1-7/8 produisant ce siRNA (figure 2, page d).

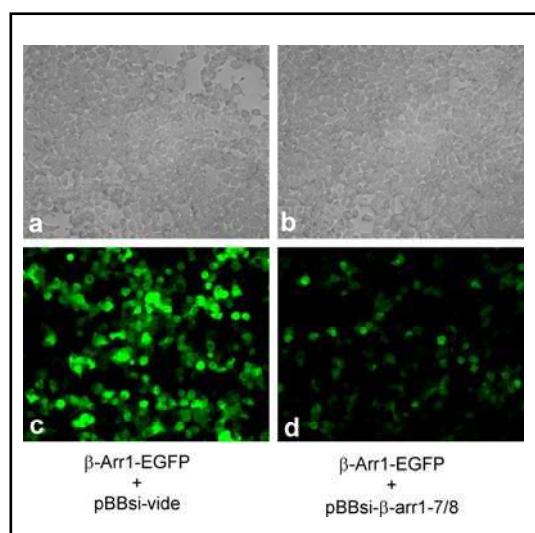


Figure 2 : Interférence ARN détectée par fluorescence des cellules

Les cellules ont été cotransfectées avec le plasmide pEGFP-N3- β Arr1 exprimant la protéine de fusion fluorescente β -arrestine 1-EGFP et le plasmide pBBsi vide (c) ou contenant la séquence siRNA β arr1-7/8 (d). Les cellules ont été photographiées avec un microscope à fluorescence (LEICA) équipé d'une caméra. Les mêmes plages photographiées en contraste de phase (a,b) présentent un nombre équivalent de cellules.

Ce résultat a été confirmé par immunodétection. Comme l'illustre la figure 3A, la présence du plasmide pBBsi- β arr1-7/8 aboutit à une quasi-suppression de l'expression de la protéine de fusion. Il est à noter que l'effet du siRNA " β -arr1-7/8" est bien spécifique à la β -arrestine 1 puisque l'expression d'une protéine ménagère, telle que l'actine, n'est pas perturbée par ce siRNA.

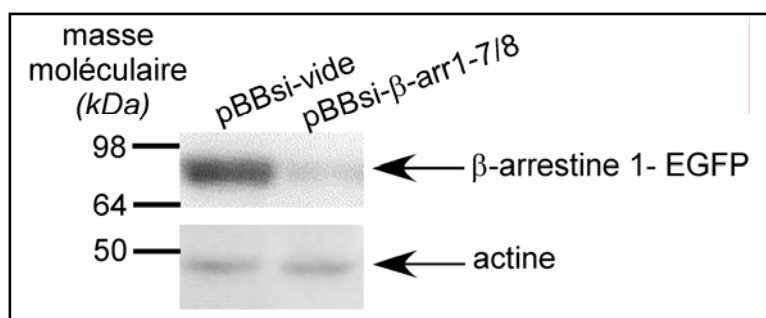


Figure 3 : Interférence ARN décelée par immunodétection

L'immunodétection a été réalisée sur des lysats de cellules HEK-293T cotransfectées avec les plasmides pEGFP-N3- β Arr1 et pBBsi vide ou contenant le siRNA, après SDS-PAGE et électrotransfert sur nitrocellulose. Les anticorps anti-EGFP révèlent la protéine de fusion β -arrestine 1-EGFP à 82 kDa et les anticorps anti-actine révèlent l'actine à 42 kDa.

Par contre, d'autres siRNA ciblant la β -arrestine 1 ont été testés et n'ont pas d'effet inhibiteur. Ceci démontre que l'efficacité de l'interférence ARN repose énormément sur le choix de la séquence cible.

II- Mise au point d'un système de production inductible de siRNA

L'inhibition de l'expression d'une protéine, par quelque technique que ce soit (recombinaison homologe, interférence ARN...), connaît des limites lorsque cette inhibition a un effet létal sur les cellules ou les organismes touchés. La technique d'**interférence ARN dans un système inductible** permettrait d'inhiber l'expression d'une protéine de façon contrôlée. Un système d'interférence ARN inductible a donc été développé au laboratoire.

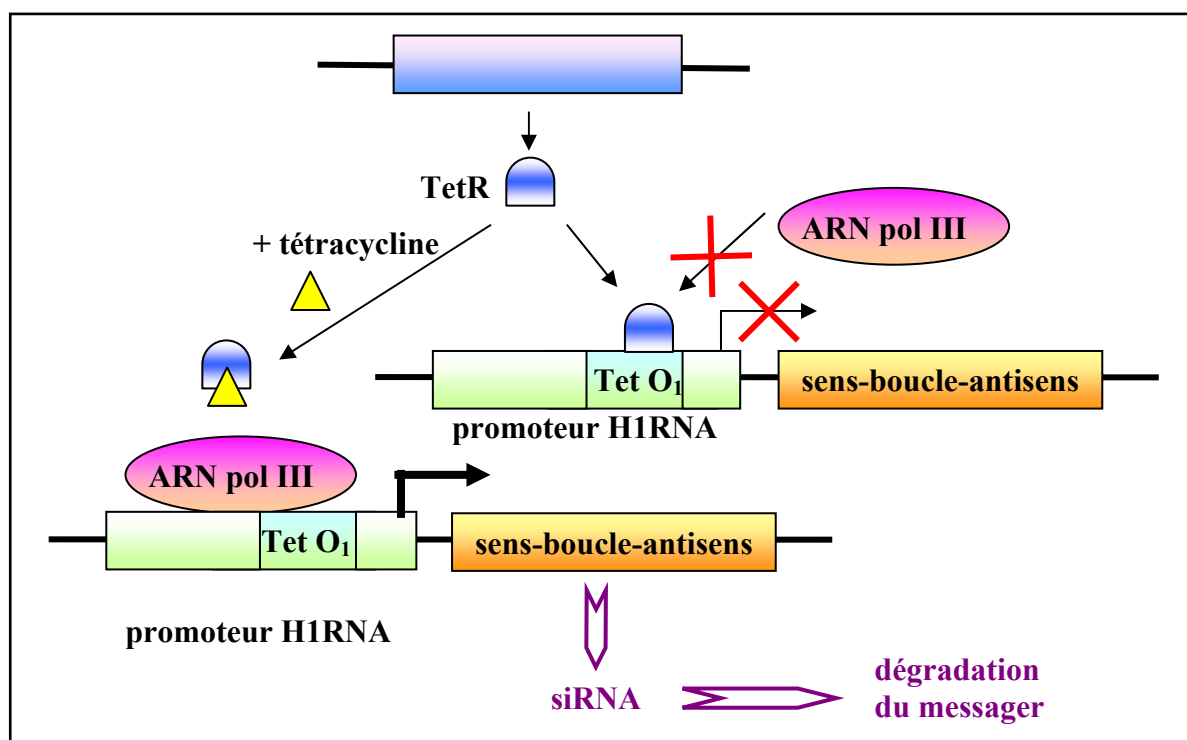


Figure 4 : Système inductible d'interférence ARN

Le système nécessite deux plasmides, l'un contenant la séquence du répresseur bactérien TetR et l'autre (pBBsi-TetO) l'ADN sens-boucle-antisens du siRNA précédé du promoteur H1RNA dans lequel la séquence de l'opérateur bactérien Tet (TetO₁) a été insérée.

Ce système est basé sur un système d'expression régulé par la tétracycline (figure 4). Dans le plasmide pBBsi-TetO, la transcription du siRNA est sous le contrôle du promoteur H1RNA spécifiquement reconnu par l'ARN polymérase III et l'opérateur bactérien TetO₁ a été inséré dans ce promoteur. Il a été vérifié que cette modification ne changeait pas l'efficacité du promoteur (résultats non montrés). La tétracycline régule la fixation du répresseur TetR sur cet opérateur. En absence de tétracycline, le répresseur TetR se fixe sur l'opérateur TetO₁ et empêche, par encombrement stérique, la fixation de l'ARN polymérase III et donc la transcription du siRNA. En présence de tétracycline, le répresseur ne peut plus se fixer sur la séquence opératrice TetO₁ et laisse le promoteur accessible à la polymérase III qui va donc transcrire la séquence d'ADN sens-boucle-antisens en siRNA.

L'efficacité et l'inductibilité de ce système de transcription de siRNA ont été testées dans les cellules HEK-293T. L'inhibition de l'expression de la protéine exogène fluorescente EGFP, pour laquelle une séquence siRNA efficace est déjà établie, a été analysée comme précédemment par fluorescence (figure 5) et immunodétection (figure 6).

Les cellules HEK-293T ont été cotransfectées avec un plasmide exprimant la protéine fluorescente EGFP, un plasmide permettant l'expression du répresseur bactérien TetR et le plasmide pBBsi-TetO vide ou contenant l'ADN sens-boucle-antisens du siRNA ciblant l'EGFP, dans un rapport 20/1/15 (µg/µg/µg). Comme le montrent les figures 5 et 6, les cellules cotransfectées avec le plasmide pBBsi-TetO vide expriment fortement la protéine fluorescente EGFP en présence de doxycycline (figure 5, plage d et figure 6, 1^{ère} piste). Dans les cellules qui ont été transfectées avec le plasmide pBBsi-TetO contenant l'ADN sens-boucle-antisens du siRNA ciblant l'EGFP, et en présence de doxycycline qui inhibe la fixation du répresseur sur le Tet opérateur, il y a une très forte réduction de l'expression de l'EGFP (figure 5, plage e et figure 6, 2^{ème} piste). En absence de doxycycline, l'EGFP est exprimée (figure 5, plage f et figure 6, 3^{ème} piste), la production du siRNA étant bloquée par la fixation du répresseur sur le Tet opérateur. On peut toutefois constater que le niveau d'expression de l'EGFP est, dans ce cas, inférieur à celui obtenu lorsque les cellules ont été transfectées avec le plasmide pBBsi-TetO vide (figure 5, plage d et figure 6, 1^{ère} piste). Ceci suggère, qu'en absence de doxycycline, c'est à dire lorsque le répresseur TetR est fixé à la séquence opératrice TetO₁, il y a néanmoins transcription à un faible niveau du siRNA.

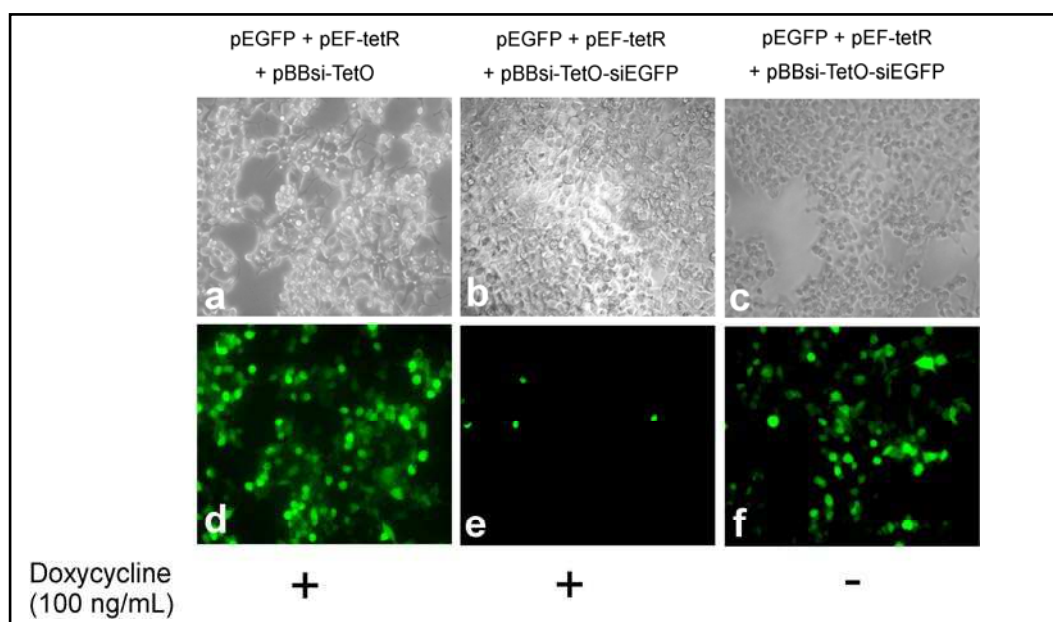


Figure 5 : Interférence ARN inducible mise en évidence par fluorescence

Les cellules ont été cotransfectées avec un plasmide exprimant la protéine fluorescente EGFP (pEGFP), un plasmide exprimant le répresseur bactérien TetR (pEF-tetR) et le plasmide pBBsi-TetO-vidé (d), ou le plasmide pBBsi-TetO-siEGFP (e, f), en présence (d, e) et en absence (f) de doxycycline. Les cellules ont été photographiées avec un microscope à fluorescence (LEICA) équipé d'une caméra. Les mêmes plages photographiées en contraste de phase (a, b et c) présentent un nombre équivalent de cellules.

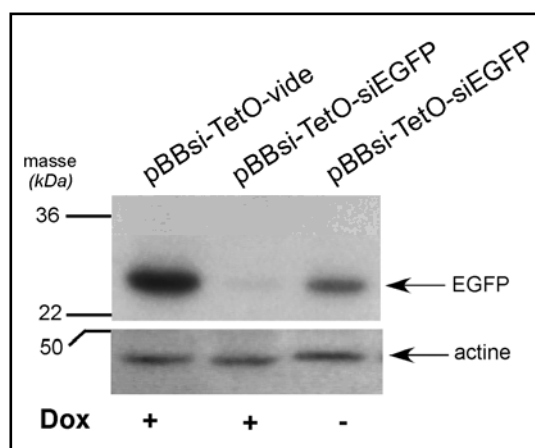


Figure 6 : Interférence ARN inducible mise en évidence par immunodétection

Après SDS-PAGE et électrotransfert sur nitrocellulose, les lysats des cellules de la figure 12 ont été analysés par immunodétection avec des anticorps anti-EGFP révélant la protéine fluorescente de 27 kDa. La révélation de l'actine par des anticorps anti-actine permet de vérifier qu'il y a la même quantité de lysat cellulaire dans chaque puits.

En résumé, deux systèmes moléculaires permettant la production de petits ARN interférents dans les cellules ont été mis au point et validés dans le type cellulaire HEK-293. L'un entraîne une inhibition continue de l'expression de la protéine visée, et l'autre assure en plus l'inductibilité de cette inhibition. Une cible efficace pour l'inhibition de l'expression de la β -arrestine 1 a été validée. L'ensemble de ces outils pourront être utilisés dans des types cellulaires variés et notamment, les cellules myéloïdes HL-60.

ANNEXE B

Résultats complets de chaque analyse protéomique

menée à partir de cellules :

- HEK-293- β Arr1-TAP non activées (essais 1 et 2)
- HEK-293- β Arr2-TAP-FPRL1 non activées (essais 1 et 2)
- HEK-293- β Arr2-TAP-FPRL1 activées 2, 5 ou 30 minutes.

PROTEIN	ACCESSION	SCORE TOTAL	SCORE RG	SCORE RNG	MW
(P35579) Myosin heavy chain, nonmuscle type A (Cellular myosin heavy chain, type A) (Nonmuscle myosin)	MYH9_HUMAN	3230.02	3571.98	0.00	226391.6
(P35580) Myosin heavy chain, nonmuscle type B (Cellular myosin heavy chain, type B) (Nonmuscle myosin)	MYHA_HUMAN	1230.44	923.74	409.16	228797.9
(P02571) Actin, cytoplasmic 2 (Gamma-actin)	ACTG_HUMAN	1035.16	1100.51	0.00	41765.8
(P13645) Keratin, type I cytoskeletal 10 (Cytokeratin 10) (K10) (CK 10)	K1CJ_HUMAN	954.64	990.84	0.00	59482.9
(Q9QZ83) Gamma actin-like protein	Q9QZ83	801.65	158.00	696.79	43572.5
(P04264) Keratin, type II cytoskeletal 1 (Cytokeratin 1) (K1) (CK 1) (67 kDa cytokeratin) (Hair alp	K2C1_HUMAN	766.40	770.38	0.00	65846.9
(P49407) Beta-arrestin 1 (Arrestin, beta 1)	ARR1_HUMAN	763.44	777.86	0.00	47036.3
(Q86Y95) Similar to myosin IC (Fragment)	Q86Y95	727.76	748.66	0.00	118076.0
(Q7Z406) Myosin heavy chain	Q7Z406	718.94	523.75	257.51	227862.8
(Q13182) Myosin regulatory light chain (Nonmuscle myosin light chain 2)	Q13182	464.61	434.81	0.00	19766.5
(P09874) Poly [ADP-ribose] polymerase-1 (EC 2.4.2.30) (PARP-1) (ADPRT) (NAD(+)-ADP-ribosyltransferase)	PPOL_HUMAN	380.54	400.53	0.00	112881.4
(Q9UM54) Myosin VI	MYO6_HUMAN	371.03	352.11	0.00	148620.0
(P35908) Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal (Cytokeratin 2e) (K2e) (CK 2e)	K22E_HUMAN	311.69	200.64	110.81	65825.4
(Q64119) Myosin light polypeptide 6 (Myosin light chain alkali 3) (Myosin light chain 3) (MLC-3) (L	MYL6_RAT	304.34	310.02	0.00	16833.1
(P35527) Keratin, type I cytoskeletal 9 (Cytokeratin 9) (K9) (CK 9)	K1CI_HUMAN	247.76	245.26	0.00	61949.8
(P46735) Myosin Ib (Myosin I alpha) (MMI-alpha) (MMIa) (MIH-L)	MY1B_MOUSE	244.62	200.38	60.86	128446.9
(P00761) Trypsin precursor (EC 3.4.21.4)	TRYP_PIG	185.66	182.30	0.00	24393.8
(Q96EN2) Hypothetical protein	Q96EN2	167.62	97.29	0.00	39675.7
(Q8N5Z7) Ribosomal protein L6	Q8N5Z7	143.66	143.66	0.00	32705.7
(P02262) Histone H2A.1	H2A1_RAT	141.00	142.42	0.00	13937.9
(Q07020) 60S ribosomal protein L18	RL18_HUMAN	119.74	119.74	0.00	21490.0
(P10853) Histone H2B F (H2B 291A)	H2B1_MOUSE	115.95	97.84	0.00	13796.5
(Q8BIS2) Similar to keratin	Q8BIS2	106.88	60.30	0.00	58230.3
(P16409) Myosin light polypeptide 3 (Myosin light chain 1, slow-twitch muscle B/ventricular isoform	MYL3_RAT	106.10	58.91	50.03	22011.0
(Q9GKX8) Heat shock protein HSP 90-beta (HSP 84) (Fragment)	HS9B_HORSE	100.52	89.51	0.00	81911.6
(Q8BT09) Ribosomal protein S6	Q8BT09	95.37	95.37	0.00	28649.9
(Q8VCR8) Myosin light chain kinase 2, skeletal/cardiac muscle (EC 2.7.1.117) (MLCK2) (Fragment)	KML2_MOUSE	91.09	91.09	0.00	27612.1
(P16106) Histone H3.1 (H3/a) (H3/c) (H3/d) (H3/f) (H3/h) (H3/i) (H3/j) (H3/k) (H3/l)	H31_HUMAN	84.89	59.62	0.00	15263.4
(Q9UHB6) Epithelial protein lost in neoplasm	EPLI_HUMAN	79.90	67.99	0.00	85173.4
(P50446) Keratin, type II cytoskeletal 6 (Cytokeratin 6) (CK 6) (K6 keratin)	K2C6_MOUSE	77.42	40.11	0.00	59282.6

(P47756) F-actin capping protein beta subunit (CapZ beta)	CAPB_HUMAN	75.86	79.53	0.00	31199.7
(Q9QZ82) Cytochrome P450 11A1, mitochondrial precursor (EC 1.14.15.6) (CYPXIA1) (P450(scc))	C11A_MOUSE	70.56	48.89	0.00	60276.2
(P40429) 60S ribosomal protein L13a (23 kDa highly basic protein)	R13A_HUMAN	66.75	66.75	0.00	23431.3
(Q60527) Tropomyosin-1	Q60527	65.73	56.71	0.00	33053.7
(Q96FH5) Similar to HERV-H LTR-associating 3	Q96FH5	64.63	43.86	0.00	13501.9
(Q04837) Single-stranded DNA-binding protein, mitochondrial precursor (Mt-SSB) (MtSSB) (PWP1-intera	SSB_HUMAN	62.58	64.00	0.00	17249.0
(Q8R102) Ribosomal protein L35	Q8R102	62.40	65.24	0.00	8948.3
(Q811L0) Similar to RIKEN cDNA 3100001N19 gene	Q811L0	60.09	60.09	0.00	18249.5
(P32391) Actin-like protein 3 (Actin-related protein 3) (Actin-2)	ARP3_HUMAN	59.60	53.43	0.00	47341.0
(Q15289) Ribosomal protein L7	Q15289	51.16	52.58	0.00	29849.6
(P48616) Vimentin	VIME_BOVIN	51.07	37.09	0.00	53513.1
(Q8K2D1) Similar to ribosomal protein S9	Q8K2D1	50.64	22.94	0.00	22597.6
(P02304) Histone H4	H4_HUMAN	48.84	48.84	0.00	11229.3
(Q91YK6) Hypothetical protein (Fragment)	Q91YK6	48.50	49.92	0.00	16929.7
(Q9ESD4) LBA isoform beta	Q9ESD4	48.45	52.71	0.00	309427.2
(Q9JIC3) SNM1 protein	Q9JIC3	45.03	31.60	0.00	113240.6
(P02253) Histone H1.1 (Fragment)	H11_BOVIN	44.76	44.76	0.00	10358.8
(Q29201) 40S ribosomal protein S16 (Fragment)	RS16_PIG	44.13	34.05	0.00	14985.1
(Q9ULV4) Coronin 1C (Coronin 3) (hCRNN4)	CO1C_HUMAN	44.01	46.85	0.00	53215.1
(P00974) Pancreatic trypsin inhibitor precursor (Basic protease inhibitor) (BPI) (BPTI) (Aprotinin)	BPT1_BOVIN	37.29	38.71	0.00	10895.4
(Q9UJV9) DEAD-box protein abstrakt homolog (DEAD-box protein 41)	ABS_HUMAN	37.28	40.12	0.00	69793.0
(P23821) 40S ribosomal protein S7 (S8)	RS7_HUMAN	34.48	29.22	0.00	22113.3
(P25111) 40S ribosomal protein S25	RS25_HUMAN	32.19	32.19	0.00	13733.7
(Q8R4C2) RUFY2	Q8R4C2	32.11	23.11	0.00	69974.9
(Q8CAD5) Thyroid hormone receptor interactor 4	Q8CAD5	31.13	34.43	0.00	61480.3
(Q8BZH7) Hypothetical ferredoxin-fold anticodon binding domain containing protein	Q8BZH7	30.98	67.64	0.00	35465.2
(Q9D2F1) 4930569K13Rik protein	Q9D2F1	30.97	33.22	0.00	52738.9
(Q95MQ3) Interferon-induced protein 1-8U	Q95MQ3	24.77	26.19	0.00	15713.1
(P52907) F-actin capping protein alpha-1 subunit (CapZ alpha-1)	CAZ1_HUMAN	23.53	24.95	0.00	32902.3
(Q8WMP8) Voltage-gated sodium channel alpha subunit	Q8WMP8	21.06	25.05	0.00	227746.4

description	accession	pl	score	mass	coverage	#peptides
<i>keratin 1; Keratin-1; cytokeratin 1; hair alpha protein [Homo sapiens]</i>	gi 17318569	8,16	689,76	66027	24,53	16
beta-arrestin 1B {alternatively spliced} [human, Peptide, 410 aa]	gi 385885	5,49	842,08	46184	33,90	18
unnamed protein product [Mus musculus]	gi 12846758	4,78	615,99	49608	25,68	11
beta tubulin [Cricetulus griseus]	gi 537407	4,79	553,62	49716	22,97	10
<i>cytokeratin 9 [Homo sapiens]</i>	gi 435476	5,19	492,41	62092	15,73	8
<i>keratin 10, type I, cytoskeletal - human</i>	gi 71528	5,17	466,32	59492	17,54	9
calmodulin 3 [Homo sapiens]	gi 4885109	4,06	406,78	17152	64,47	8
tubulin alpha 6 [Homo sapiens]	gi 14389309	4,96	400,40	49863	20,94	7
nuclear corepressor KAP-1 [Homo sapiens]	gi 1699027	5,52	401,62	88479	11,26	7
M2-type pyruvate kinase	gi 189998	7,95	358,61	57877	22,41	8
<i>Keratin 6B [Homo sapiens]</i>	gi 21961227	8,09	342,69	60030	13,65	9
Fatty acid synthase [Homo sapiens]	gi 38648667	5,99	322,97	273227	4,30	10
<i>Keratin 6A [Homo sapiens]</i>	gi 15559584	8,09	313,97	59981	11,88	8
<i>keratin 14; cytokeratin 14 [Homo sapiens]</i>	gi 15431310	5,09	313,04	51589	13,14	6
mutant beta-actin (beta'-actin) [Homo sapiens]	gi 28336	5,22	283,57	41786	17,60	6
<i>Trypsin precursor</i>	gi 136429	7,00	229,09	24394	25,11	4
solute carrier family 25 member 6; adenine nucleotide translocator 3 (liver) [Bos taurus]	gi 32189336	9,82	270,68	32856	23,83	7
adaptor-related protein complex 2, beta 1 subunit; adaptin, beta 2 (beta); clathrin-associated/asse	gi 4557469	5,22	190,46	104486	7,47	6
ADP/ATP carrier protein (adenine nucleotide translocator 2) [Homo sapiens]	gi 2772564	9,71	262,46	32831	23,83	7
Solute carrier family 25, member A6 [Homo sapiens]	gi 21594693	9,76	260,11	32845	23,83	7
<i>type I keratin 16; K16 [Homo sapiens]</i>	gi 1195531	4,98	232,23	51206	10,57	5
<i>epidermal cytokeratin 2 [Homo sapiens]</i>	gi 181402	8,07	239,40	65825	9,77	6
<i>Keratin 5 [Homo sapiens]</i>	gi 47940601	7,58	238,04	62340	9,66	7
<i>cytokeratin endo A [Mus musculus]</i>	gi 220392	5,70	218,17	54531	10,00	6
<i>keratin 8, type II cytoskeletal - human</i>	gi 105815	5,36	215,93	53715	11,59	6
heat shock protein 90-beta [validated] - human	gi 72222	4,97	178,90	83242	6,49	4
transcription factor NF-AT 45K chain - human	gi 1082855	8,26	191,51	44669	13,55	4
unnamed protein product [Mus musculus]	gi 50819	5,40	137,46	44464	10,51	4
similar to Elongation factor 1-alpha 1 (EF-1-alpha-1) (Elongation factor 1 A-1) (eEF1A-1) (Elongati	gi 34881719	9,30	126,65	41199	8,20	3
Heat-Shock Cognate 70kd Protein 44kd Atpase N-Terminal 1nge 3	gi 3402101	7,03	159,73	42443	9,33	3
KIAA0002 [Homo sapiens]	gi 1136741	5,75	170,79	58465	8,53	4

Chain E, Human Pdna	gi 2914387	4,57	117,53	28730	11,88	3
matricin - mouse	gi 631730	6,23	166,52	60450	6,07	3
Eukaryotic translation elongation factor 1 gamma [Homo sapiens]	gi 15530265	6,25	152,87	50115	9,15	4
transformation upregulated nuclear protein [Homo sapiens]	gi 460789	5,13	136,51	51040	4,74	2
AP2A1 protein [Homo sapiens]	gi 15559717	7,73	100,06	107899	2,14	2
ribosomal protein S3, cytosolic [validated] - rat	gi 70850	9,63	98,05	26643	9,47	3
P43 [Homo sapiens]	gi 833999	7,69	121,82	49502	9,07	3
Human Platelet Profilin I Crystallized In High Salt Actin-Binding Protein	gi 1943532	8,47	100,44	14914	20,14	2
dnaK-type molecular chaperone HSPA6 - human	gi 87626	5,67	106,93	70810	3,73	2
unnamed protein product [Homo sapiens]	gi 14042895	6,95	106,58	73070	5,03	3
casein alphaS1	gi 225632	4,85	102,71	24420	10,28	2
Myosin light chain kinase 2, skeletal/cardiac muscle (MLCK2)	gi 125493	5,13	101,34	65427	1,81	2
clathrin heavy chain 1; clathrin, heavy polypeptide-like 2 [Homo sapiens]	gi 4758012	5,48	94,12	191493	1,25	2
chaperonin-like protein	gi 184462	6,19	75,01	42901	3,08	1
replication licensing factor MCM4 - human	gi 7428558	6,28	66,22	96551	1,51	1
Ig kappa chain b4	gi 165371	5,38	68,10	23298	6,36	1
mCBP [Mus musculus]	gi 495128	8,48	74,08	34994	7,25	2
chaperonin	gi 460317	8,42	72,74	58085	2,41	1
Ube2m protein [Mus musculus]	gi 20071813	9,34	81,57	12051	20,59	2
p105MCM	gi 1197636	5,32	66,46	93032	2,92	2
Ig mu chain C region membrane-bound form	gi 127511	5,54	69,05	52318	5,43	2
2-phosphopyruvate-hydratase alpha-enolase; carbonate dehydratase [Homo sapiens]	gi 693933	7,01	67,93	47079	3,00	1
Ig gamma chain C region	gi 121088	8,62	55,54	35382	4,64	2
<i>DNA-activated protein kinase, catalytic subunit - human</i>	gi 1362789	6,81	45,96	465127	0,27	1
sub2.3 [Homo sapiens]	gi 444021	6,24	56,63	31695	8,03	2
<i>C-1-tetrahydrofolate synthase, cytoplasmic (C1-THF synthase) [Includes: Methylenetetrahydrofolate d</i>	gi 115206	6,89	56,37	101495	1,28	1
<i>DDX17 protein [Homo sapiens]</i>	gi 12653635	8,82	49,41	72326	1,85	1
<i>similar to DNA replication licensing factor MCM3 (DNA polymerase alpha holoenzyme-associated protei</i>	gi 34874841	5,48	35,86	90087	1,50	1
<i>clCK0721Q.2 (60S Ribosomal Protein L12 LIKE protein) [Homo sapiens]</i>	gi 3169116	9,57	44,48	17915	5,45	1
<i>translation initiation factor eIF-4A2 homolog - human</i>	gi 631472	6,08	40,15	46803	2,68	1
<i>HuR RNA binding protein</i>	gi 1022961	9,23	37,34	36039	3,99	1
<i>phosphate carrier protein precursor, mitochondrial, splice form B - bovine</i>	gi 627754	9,37	35,88	39978	3,32	1

<i>t complex polypeptide 1</i>	gil201723	6,03	33,58	25962	4,22	1
<i>nuclear RNA helicase (DEAD family) homolog - rat</i>	gil539961	6,65	32,58	45586	2,51	1
<i>kappa-casein - goat</i>	gil71821	6,08	30,11	19149	5,85	1
<i>minichromosome maintenance protein 7; mini chromosome maintenance deficient 7 (S. cerevisiae) [Mus</i>	gil10242373	5,98	30,00	81159	1,39	1
<i>beta casein B [Bos taurus]</i>	gil13661026	9,02	22,24	16443	6,16	1

description	accession	pl	score	mass	coverage	#peptides
arrestin, beta 2 [Rattus norvegicus]	gi 6978539	7,58	1281,32	46311	43,66	22
protein kinase, DNA-activated, catalytic polypeptide [Homo sapiens]	gi 32140473	6,75	908,91	468788	5,18	20
Beta 5-tubulin [Homo sapiens]	gi 18088719	4,75	838,34	49640	36,04	16
calmodulin 3 [Homo sapiens]	gi 4885109	4,06	775,54	17152	73,03	13
<i>keratin 1; Keratin-1; cytokeratin 1; hair alpha protein [Homo sapiens]</i>	gi 17318569	8,16	744,16	66027	18,63	14
beta tubulin [Cricetulus griseus]	gi 537407	4,79	754,55	49716	36,04	16
Chain A, Crystal Structure Of Bovine Brain Ca++ Calmodulin In A Compact Form	gi 38492836	4,04	719,57	16790	61,74	11
fatty acid synthase [Homo sapiens]	gi 41584442	5,97	688,97	273277	7,33	16
heat shock protein 90-beta [validated] - human	gi 72222	4,97	684,25	83242	19,34	13
unnamed protein product [Mus musculus]	gi 12851187	4,81	647,71	49496	28,83	13
beta-tubulin [Homo sapiens]	gi 1297274	4,86	551,64	50485	25,33	11
dnaK-type molecular chaperone HSPA1L - human	gi 2119712	5,42	443,50	69825	16,56	10
tubulin alpha 6 [Homo sapiens]	gi 14389309	4,96	429,30	49863	24,50	8
nuclear corepressor KAP-1 [Homo sapiens]	gi 1699027	5,52	391,83	88479	10,90	7
heat shock protein 90-alpha - human	gi 72219	4,94	410,91	84607	11,07	7
<i>keratin 10, type I, cytoskeletal - human</i>	gi 71528	5,17	420,14	59492	14,17	9
similar to calmodulin 1; Calmodulin 1 (phosphorylase kinase, delta); Calmodulin 1 (phosphorylase ki	gi 51712699	4,54	396,45	27672	19,76	7
<i>cytokeratin endo A [Mus musculus]</i>	gi 220392	5,70	357,37	54531	11,84	7
postreplication repair protein hRAD18p; RAD18, S. cerevisiae, homolog [Homo sapiens]	gi 14550405	7,17	347,06	56159	15,56	8
DDX17 protein [Homo sapiens]	gi 12653635	8,82	330,38	72326	14,00	8
pyruvate kinase (EC 2.7.1.40), muscle splice form M2 - human	gi 478822	7,58	298,79	57841	11,68	7
ADP,ATP carrier protein T2 - mouse	gi 423368	9,71	302,05	33061	20,47	6
eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1; elongation factor Tu; elongation factor 1 A-1 [gi 51873060	9,16	321,74	50024	18,61	8
Solute carrier family 25, member A6 [Homo sapiens]	gi 21594693	9,76	291,07	32845	20,47	6
solute carrier family 25 member 6; adenine nucleotide translocator 3 (liver) [Bos taurus]	gi 32189336	9,82	293,73	32856	20,47	6
Chain A, Solution Structure Of Calcium-Calmodulin N-Terminal Domain	gi 16974825	4,01	309,40	8483	48,68	6
Phosphoprotein	gi 473912	5,25	306,75	50961	14,66	6
Chain E, Leech-Derived Trypsin InhibitorTRYPSIN COMPLEX	gi 3318722	8,26	308,24	23457	26,01	5
<i>epidermal cytokeratin 2 [Homo sapiens]</i>	gi 181402	8,07	288,24	65825	11,63	7

replication licensing factor MCM7 - human	gil2134885	6,08	280,41	81230	7,65	5
S3 ribosomal protein [Homo sapiens]	gil7765076	9,70	265,43	26699	34,57	7
growth regulated nuclear 68 protein	gil226021	8,95	234,30	66881	7,07	4
mutant beta-actin (beta'-actin) [Homo sapiens]	gil28336	5,22	276,94	41786	22,67	7
Ig gamma H-chain C-region [Oryctolagus cuniculus]	gil457366	8,29	241,89	35270	15,53	5
Eukaryotic translation elongation factor 1 gamma [Homo sapiens]	gil15530265	6,25	266,41	50115	13,96	6
calmodulin, Ca(2+)-dependent ganglioside-binding protein [mice, brain, Peptide Partial, 57 aa, segm	gil249171	4,10	251,98	6439	47,37	5
<i>cytokeratin 9 [Homo sapiens]</i>	gil435476	5,19	258,21	62092	9,47	5
Hsc70-ps1 [Rattus norvegicus]	gil56385	5,43	250,14	70884	10,06	6
HNRPU protein [Homo sapiens]	gil39645240	6,97	242,36	78333	7,38	5
ENO1 protein [Homo sapiens]	gil29792061	7,01	217,60	47139	9,91	3
Vimentin	gil340219	5,03	234,83	53681	8,80	5
adaptor-related protein complex 2, alpha 2 subunit; alpha-adaptin C; Huntingtin interacting protein	gil27477041	6,53	177,57	103895	4,47	4
C-1-tetrahydrofolate synthase, cytoplasmic (C1-THF synthase) [Includes: Methylenetetrahydrofolate d	gil115206	6,89	206,09	101495	4,39	4
U5 snRNP-specific protein, 200 kDa [Mus musculus]	gil38649232	5,73	188,16	244392	2,43	5
Human Platelet Profilin I Crystallized In High Salt Actin-Binding Protein	gil1943532	8,47	175,93	14914	30,22	3
ribonucleoside-diphosphate reductase M1 chain; ribonucleotide reductase, large subunit; ribonucleot	gil4506749	6,76	183,87	90013	5,18	5
unnamed protein product [Mus musculus]	gil53600	4,66	177,21	28796	16,48	3
structure specific recognition protein 1; recombination signal sequence recognition protein; chroma	gil4507241	6,45	166,84	81024	5,78	4
similar to Adaptor-related protein complex 2 alpha 1 subunit (Alpha-adaptin A) (Adaptor protein com	gil34856047	6,27	112,87	103903	3,28	3
mitochondrial elongation factor G1; elongation factor G1 [Homo sapiens]	gil18390331	6,58	147,18	83418	3,46	3
immunoglobulin kappa chain [Oryctolagus cuniculus]	gil1100745	4,77	152,29	25066	10,50	2
huMCM5 [Homo sapiens]	gil1232079	8,71	121,72	81780	4,91	3
multifunctional protein CAD [Homo sapiens]	gil1228049	6,00	126,22	242762	1,80	4
ATP citrate (pro-S)-lyase - human	gil105392	6,42	137,08	121342	2,26	2
P43 [Homo sapiens]	gil833999	7,69	143,68	49502	7,96	3
Ig mu chain C region membrane-bound form	gil127511	5,54	122,45	52318	10,23	4
chromatin-specific transcription elongation factor large subunit [Homo sapiens]	gil6005757	5,50	121,44	119838	1,91	2
ribosomal protein	gil198578	11,12	131,91	17730	13,16	2

ribosomal protein S16; EST AI317031 [Mus musculus]	gi 7305445	10,21	129,29	16346	22,07	3
similar to Myosin light chain kinase 2, skeletal/cardiac muscle (MLCK2) [Mus musculus]	gi 51712779	5,32	104,39	73497	1,63	2
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L (hnRNP L) (P/OKcl.14)	gi 133274	6,65	123,72	60149	5,38	3
Ig kappa chain b4	gi 165371	5,38	122,40	23298	11,36	2
unnamed protein product [Mus musculus]	gi 50819	5,40	119,67	44464	8,46	3
similar to ubiquitin-conjugating enzyme E2M; UBC12 homolog, yeast [Rattus norvegicus]	gi 34854538	7,57	117,74	20887	16,39	3
similar to Eif4g1 protein [Mus musculus]	gi 51769453	5,39	111,14	198674	1,49	3
Tat-SF1 [Homo sapiens]	gi 1667611	4,29	101,59	85708	3,71	3
adaptor-related protein complex 2, beta 1 subunit; adaptin, beta 2 (beta); clathrin-associated/asse	gi 4557469	5,22	92,98	104486	2,45	2
type I keratin 16; K16 [Homo sapiens]	gi 1195531	4,98	105,21	51206	7,19	3
phosphofructokinase, platelet; Phosphofructokinase, platelet type [Homo sapiens]	gi 11321601	7,50	91,36	85542	2,81	2
mCBP [Mus musculus]	gi 495128	8,48	84,14	34994	7,25	2
KIAA1835 protein [Homo sapiens]	gi 14017887	4,69	95,69	67291	3,53	2
eukaryotic protein synthesis initiation factor [Homo sapiens]	gi 3941724	5,23	93,02	171457	1,35	2
Ig kappa chain precursor V-J region (clone vkB95r) - rabbit (fragment)	gi 90050	7,63	92,73	12331	13,45	1
keratin 17 [Homo sapiens]	gi 4557701	4,97	91,73	48076	4,63	2
phosphoglycerate kinase 1 [Homo sapiens]	gi 4505763	8,30	90,51	44586	10,79	3
hRlf beta subunit (p102 protein) [Homo sapiens]	gi 1552242	5,49	84,59	90884	3,47	3
transcription factor NF-AT 45K chain - human	gi 1082855	8,26	89,76	44669	6,16	2
hyperplastic discs protein [Mus musculus]	gi 47498599	5,59	69,75	308169	0,64	2
unnamed protein product [Homo sapiens]	gi 7022907	9,26	55,93	66177	1,88	1
TFG [Homo sapiens]	gi 1552328	4,94	87,35	43407	4,50	2
guanine monophosphate synthetase; GMP synthase; guanosine 5'-monophosphate synthase; glutamine amid	gi 4504035	6,42	84,61	76667	3,32	2
pyruvate dehydrogenase E1-alpha precursor	gi 387011	8,79	74,86	46243	5,31	2
clathrin heavy chain 1; clathrin, heavy polypeptide-like 2 [Homo sapiens]	gi 4758012	5,48	84,43	191493	1,19	2
translation initiation factor eIF-4A2 homolog - human	gi 631472	6,08	57,97	46803	2,68	1
ICBP90 binding protein 1; CG31653-PA-like [Homo sapiens]	gi 33350930	5,75	73,12	154622	1,71	2
immunoglobulin kappa light chain [Oryctolagus cuniculus]	gi 6502848	4,29	83,39	11876	14,04	1
ATPase, Ca++ transporting, cardiac muscle, slow twitch 2 isoform 1; ATPase, Ca++ dependent, slow-tw	gi 24638454	5,23	55,70	114683	1,25	1

nucleophosmin/nucleoplasmin3 [Homo sapiens]	gi 5801867	4,53	77,13	19293	8,99	1
similar to Glycyl-tRNA synthetase [Rattus norvegicus]	gi 34855920	8,69	65,61	114312	2,43	2
Sodium/potassium-transporting ATPase alpha-1 chain precursor (Sodium pump 1) (Na+/K+ ATPase 1)	gi 114377	5,36	67,10	112586	2,35	2
sirtuin 1 ((silent mating type information regulation 2, homolog) 1; sir2-like 1 [Mus musculus]	gi 9790229	4,60	62,65	80322	1,36	1
eukaryotic translation initiation factor 2B, subunit 5 epsilon, 82kDa; eukaryotic translation initi	gi 33667023	4,98	70,89	80315	3,05	2
<i>cytokeratin</i>	gi 532610	5,22	65,83	47509	3,78	2
similar to hypothetical protein FLJ10613 [Rattus norvegicus]	gi 34879870	9,37	58,11	101088	2,02	2
Similar to ribosomal protein S8 [Homo sapiens]	gi 13542987	9,73	66,11	9277	30,00	2
ribosomal protein S6	gi 337514	10,90	62,05	28614	4,82	1
protein phosphatase 1G (formerly 2C), magnesium-dependent, gamma isoform; fibroblast growth factor	gi 6679793	4,27	61,70	58691	2,03	1
DNA replication licensing factor MCM4 (CDC21 homolog) (P1-CDC21)	gi 1705521	6,77	61,53	96676	1,51	1
p105MCM	gi 1197636	5,32	40,07	93032	1,22	1
hypothetical protein FLJ10233 [Homo sapiens]	gi 8922301	5,94	59,71	73155	1,99	1
hypothetical protein [Homo sapiens]	gi 5262595	4,99	46,01	126417	0,97	1
unnamed protein product [Homo sapiens]	gi 7022978	5,22	57,89	91551	2,26	2
similar to ADP/ATP carrier proteins; match to EST AA360112 (NID: g2012453), similar to U00052 (PID:	gi 2337885	5,96	57,58	20527	4,28	1
heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H2; heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H' [Homo sapien	gi 9624998	5,89	56,31	49232	3,79	1
Chain A, Single Stranded Dna-Binding Domain Of Human Replication Protein A Bound To Single Stranded	gi 2624702	5,74	51,07	27467	5,28	1
<i>Ap3b1 protein [Mus musculus]</i>	gi 15929245	5,43	36,04	123079	0,99	1
coatamer protein complex, subunit beta; beta coat protein [Homo sapiens]	gi 7705369	5,72	43,57	107074	1,05	1
solute carrier family 25 member 3 isoform a precursor; phosphate carrier; mitochondrial phosphate c	gi 6031192	9,45	51,78	40069	2,76	1
hypothetical protein DKFZp762I166.1 - human (fragment)	gi 11346453	5,05	50,25	31417	3,53	1
<i>interferon-dependent positive-acting transcription factor ISGF-3 91K chain - human</i>	gi 422969	5,80	35,11	85991	1,22	1
<i>hypothetical protein DKFZp564C186.1 - human (fragment)</i>	gi 7512721	5,34	27,46	85194	1,33	1
<i>t-complex polypeptide 1 homolog (peak 7 fraction) - rabbit (fragments)</i>	gi 627814	4,68	39,05	2464	54,55	1
<i>t complex polypeptide 1b - mouse</i>	gi 91330	6,09	43,46	57418	1,89	1
<i>hnRNP C protein C-terminal fragment (158 AA) [Rattus sp.]</i>	gi 57810	9,67	47,69	18008	8,86	1
<i>programmed cell death 8 isoform 1; apoptosis-inducing factor [Homo</i>	gi 4757732	9,04	45,49	66859	1,79	1

sapiens]

eukaryotic translation elongation factor 2; polypeptidyl-tRNA translocase

[Homo sapiens]

nuclear RNA helicase (DEAD family) homolog - rat

ribosomal protein L4, cytosolic [validated] - rat

Ig kappa-B4 chain C region (K-bas) - rabbit

tripartite motif-containing 25; Zinc finger protein-147; zinc finger protein
147 (estrogen-respons

KIAA0776 protein [Homo sapiens]

HuR RNA binding protein

glutaminyl-tRNA synthetase; glutamine-tRNA synthetase [Homo sapiens]

solute carrier family 25 (mitochondrial carrier; oxoglutarate carrier),
member 11; solute carrier fPREDICTED: similar to ribosomal protein S3a; 40S ribosomal protein
S3a; v-fos transformation effect

similar to interleukin enhancer binding factor 3 [Rattus norvegicus]

myosin I beta [Homo sapiens]

chaperonin

clathrin coat assembly protein AP50, brain - bovine (fragments)

unnamed protein product [Homo sapiens]

similar to histone deacetylase 9 isoform 5; histone deacetylase 7B;
histone deacetylase 7; MEF-2 in

proline and glutamic acid rich nuclear protein isoform [Homo sapiens]

gi 4503483	6,41	44,39	95277	1,28	1
gi 539961	6,65	44,34	45586	2,51	1
gi 1363989	11,02	36,57	47280	2,85	1
gi 109291	4,64	42,02	11372	13,21	1
gi 4827065	8,44	41,61	70944	1,90	1
gi 3882273	6,36	38,33	89996	1,25	1
gi 1022961	9,23	36,53	36039	3,99	1
gi 4826960	6,71	36,00	87743	1,29	1
gi 21361114	9,92	35,84	34040	5,10	1
gi 41204887	9,16	35,08	24805	4,13	1
gi 34879773	7,64	30,26	67337	1,63	1
gi 1926311	9,51	34,14	117965	0,97	1
gi 460317	8,42	33,68	58085	2,41	1
gi 89478	6,29	33,25	14286	6,50	1
gi 35844	4,66	31,75	49873	2,39	1
gi 51828994	8,77	30,05	199907	0,60	1
gi 3168604	4,22	30,14	109069	0,78	1

description	accession	pl	score	mass	coverage	#peptides
arrestin, beta 2 [Rattus norvegicus]	gi 6978539	7,62	1051,84	45127	50,75	21
keratin 1 [Homo sapiens]	gi 7331218	8,16	485,16	65978	19,72	10
nuclear corepressor KAP-1 [Homo sapiens]	gi 1699027	5,52	314,37	88479	10,78	6
epidermal cytokeratin 2 [Homo sapiens]	gi 181402	8,07	301,79	65825	11,01	6
Tat-SF1 [Homo sapiens]	gi 1667611	4,29	275,67	85708	9,15	5
unnamed protein product [Homo sapiens]	gi 28317	5,17	266,49	59492	11,30	5
AP-3 complex beta3A subunit [Homo sapiens]	gi 1923268	5,67	203,52	121146	4,94	5
dishevelled 2 [Homo sapiens]	gi 4758216	5,67	211,15	78899	11,41	6
heat shock protein	gi 386785	5,42	214,68	69825	9,53	5
Trypsin precursor	gi 136429	7,00	188,95	24394	20,78	3
adaptor-related protein complex 2, alpha 2 subunit [Homo sapiens]	gi 27477041	6,53	154,61	103895	6,39	5
beta tubulin [Cricetulus griseus]	gi 537407	4,79	170,33	49716	11,26	5
Tubulin alpha 6 [Homo sapiens]	gi 13436317	4,96	146,11	49863	11,58	4
unnamed protein product [Mus musculus]	gi 52789	5,50	149,18	54415	4,91	2
Keratin 6B [Homo sapiens]	gi 21961227	8,09	148,70	60030	6,03	3
chromatin-specific transcription elongation factor large subunit [Homo sapiens]	gi 6005757	5,50	145,70	119838	2,96	3
cytokeratin 9 [Homo sapiens]	gi 435476	5,19	95,00	62092	4,01	2
Myosin light chain kinase 2, skeletal/cardiac muscle (MLCK2)	gi 125493	5,13	108,30	65427	1,81	2
Keratin 5 [Homo sapiens]	gi 47940601	7,58	101,20	62340	3,90	2
zinc finger DNA binding protein [Homo sapiens]	gi 8895212	7,17	58,64	54770	1,86	1
Chain B, Beta2-Adaptin Appendage Domain, From Clathrin Adaptor Ap2	gi 10120837	8,36	40,02	29037	8,91	2
Structure-specific recognition protein 1 (SSRP1) (Recombination signal sequence recognition protein	gi 730842	6,10	57,18	63936	1,96	1
Ig gamma-2 chain C region (clone 32.2) - bovine (fragment)	gi 89611	8,04	56,79	36020	3,06	1
cytokeratin 18 (424 AA) [Homo sapiens]	gi 30311	5,27	44,30	47305	2,83	1
growth regulated nuclear 68 protein	gi 226021	8,95	44,01	66881	2,02	1
hnRNP U protein [Homo sapiens]	gi 32358	5,60	41,53	88890	1,86	1
Ig gamma H-chain C-region [Oryctolagus cuniculus]	gi 457366	8,29	37,49	35270	5,28	1

description	accession	pl	score	mass	coverage	#peptides
arrestin, beta 2 [Rattus norvegicus]	gi 6978539	7,58	936,39	46311	41,22	18
keratin 10, type I, cytoskeletal - human	gi 71528	5,17	892,24	59492	24,62	15
keratin 1; Keratin-1; cytokeratin 1; hair alpha protein [Homo sapiens]	gi 17318569	8,16	858,42	66027	23,14	15
epidermal cytokeratin 2 [Homo sapiens]	gi 181402	8,07	678,42	65825	21,86	13
AP-3 complex beta3A subunit [Homo sapiens]	gi 1923268	5,67	472,41	121146	10,98	12
calmodulin 3 [Homo sapiens]	gi 4885109	4,06	428,70	17152	61,84	10
Tubulin beta chain	gi 135490	4,78	397,86	49829	21,12	8
cytokeratin 9 [Homo sapiens]	gi 435476	5,19	380,18	62092	12,04	7
beta tubulin [Cricetulus griseus]	gi 49481	4,85	353,52	49710	20,72	8
Chain E, Leech-Derived Trypsin InhibitorTRYPSIN COMPLEX	gi 3318722	8,26	349,23	23457	26,01	5
keratin 8, type II cytoskeletal - human	gi 105815	5,36	204,27	53715	10,35	5
Tat-SF1 [Homo sapiens]	gi 1667611	4,29	195,05	85708	5,84	4
nuclear corepressor KAP-1 [Homo sapiens]	gi 1699027	5,52	182,18	88479	7,07	4
dnaK-type molecular chaperone HSPA1L - human	gi 2119712	5,42	173,33	69825	7,50	4
Chain A, Solution Structure Of Calcium-Calmodulin N-Terminal Domain	gi 16974825	4,01	186,40	8483	27,63	3
FYVE and coiled-coil domain containing 1; RUN and FYVE domain containing 3 [Homo sapiens]	gi 13470092	4,85	169,44	166891	2,37	3
adaptor-related protein complex 2, beta 1 subunit; adaptin, beta 2 (beta); clathrin-associated/asse	gi 4557469	5,22	130,32	104486	4,91	4
alpha-tubulin [Homo sapiens]	gi 37492	5,02	174,26	50126	7,54	3
ICBP90 binding protein 1; CG31653-PA-like [Homo sapiens]	gi 33350930	5,75	160,95	154622	3,07	3
chromatin-specific transcription elongation factor large subunit [Homo sapiens]	gi 6005757	5,50	133,82	119838	3,44	3
Hsc70-ps1 [Rattus norvegicus]	gi 56385	5,43	151,22	70884	5,57	3
ADP,ATP carrier protein T2 - human	gi 86755	9,71	149,89	32960	12,08	3
solute carrier family 25 member 4; ADP/ATP translocase T1; adenine nucleotide translocator 1 (skele	gi 32189340	9,84	149,50	32946	12,08	3
DNA-activated protein kinase, catalytic subunit - human	gi 1362789	6,81	100,14	465127	0,56	2
DEAD-box protein 3, Y-chromosomal	gi 6014945	6,96	121,72	73049	4,85	3
Bruton's tyrosine kinase-associated protein-135; BAP-135 [Homo sapiens]	gi 1870688	8,23	121,21	107812	3,34	3
adaptor-related protein complex 2, alpha 2 subunit; alpha-adaptin C; Huntingtin interacting protein	gi 27477041	6,53	111,19	103895	3,51	3
Myosin light chain kinase 2, skeletal/cardiac muscle (MLCK2)	gi 125493	5,13	105,35	65427	1,81	2
growth regulated nuclear 68 protein	gi 226021	8,95	103,73	66881	3,87	2

squamous cell carcinoma antigen recognized by T cells 3; tat-interacting protein of 110 kDa [Homo s	gil7661952	5,45	93,66	109865	2,08	2
adaptor protein complex AP-2, alpha 1 subunit; adaptor-related protein complex AP-2, alpha 1 subunit	gil6671561	6,63	90,04	107596	2,15	2
Ig mu chain C region membrane-bound form	gil127511	5,54	98,17	52318	5,64	2
structure specific recognition protein 1; recombination signal sequence recognition protein; chroma	gil4507241	6,45	81,18	81024	3,67	2
transformation upregulated nuclear protein [Homo sapiens]	gil460789	5,13	85,70	51040	4,74	2
M2-type pyruvate kinase	gil189998	7,95	64,04	57877	4,14	2
Keratin 5 [Homo sapiens]	gil47940601	7,58	81,32	62340	3,22	2
p85Mcm protein [Homo sapiens]	gil755746	7,66	80,58	69220	3,73	2
trypsinogen 7 [Mus musculus]	gil2358072	8,22	53,31	26405	4,86	1
unnamed protein product [Homo sapiens]	gil31092	9,10	55,36	50095	5,19	1
translation elongation factor EF-Tu precursor - bovine	gil2119917	6,75	69,14	49376	2,65	1
sirtuin 1 ((silent mating type information regulation 2, homolog) 1; sir2-like 1 [Mus musculus]	gil9790229	4,60	68,73	80322	1,36	1
ubiquitin - Mediterranean fruit fly	gil70637	6,56	32,93	8446	12,16	1
unnamed protein product [Mus musculus]	gil50819	5,40	37,65	44464	2,56	1
DNA polymerase alpha holoenzyme-associated protein P1 - mouse (fragment)	gil1083447	3,84	45,02	3026	46,15	1
Ig gamma-2 chain C region (clone 32.2) - bovine (fragment)	gil89611	8,04	27,28	36020	3,06	1
alternatively spliced Trp4 [Mus musculus]	gil2935630	6,51	22,67	102116	0,45	1
similar to apoptosis signal-regulating kinase 2 [Rattus norvegicus]	gil34871782	7,33	21,49	172974	0,26	1
similar to T-cell activation Rho GTPase-activating protein isoform b [Rattus norvegicus]	gil34857486	7,75	22,67	147459	0,30	1

description	accession	pl	score	mass	coverage	#peptides
keratin 1; Keratin-1; cytokeratin 1; hair alpha protein [Homo sapiens]	gil17318569	8,16	1047,53	66027	31,21	18
arrestin, beta 2 [Rattus norvegicus]	gil6978539	7,58	917,52	46311	42,44	17
keratin 10, type I, cytoskeletal - human	gil71528	5,17	862,34	59492	24,96	16
epidermal cytokeratin 2 [Homo sapiens]	gil181402	8,07	747,97	65825	26,82	15
ARRB2 [Homo sapiens]	gil47496567	7,59	707,90	46061	32,27	13
AP-3 complex beta3A subunit [Homo sapiens]	gil1923268	5,67	551,99	121146	11,07	12
troponin C-like protein	gil223036	4,12	481,70	16696	52,03	9
cytokeratin 9 [Homo sapiens]	gil435476	5,19	470,65	62092	18,46	10
Chain E, Leech-Derived Trypsin InhibitorTRYPSIN COMPLEX	gil3318722	8,26	366,25	23457	26,01	5
Tubulin beta chain	gil135490	4,78	359,26	49829	21,12	8
hsp70A1	gil193983	5,46	332,87	69951	13,26	7
beta tubulin [Cricetulus griseus]	gil49481	4,85	347,51	49710	20,72	8
tubulin alpha 6 [Homo sapiens]	gil14389309	4,96	303,43	49863	19,15	6
chromatin-specific transcription elongation factor large subunit [Homo sapiens]	gil6005757	5,50	245,85	119838	7,55	6
Keratin 5 [Homo sapiens]	gil47940601	7,58	227,27	62340	10,68	6
postreplication repair protein hRAD18p; RAD18, S. cerevisiae, homolog [Homo sapiens]	gil14550405	7,17	224,39	56159	12,12	6
ICBP90 binding protein 1; CG31653-PA-like [Homo sapiens]	gil33350930	5,75	193,84	154622	4,00	5
cytokeratin endo A [Mus musculus]	gil220392	5,70	168,80	54531	8,98	4
Chain A, Solution Structure Of Calcium-Calmodulin N-Terminal Domain	gil16974825	4,01	207,41	8483	39,47	4
DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 5; D-E-A-D (aspartate-glutamate-alanine-aspartate) box polyp	gil6681157	9,06	180,02	69277	5,54	3
keratin type 16	gil186685	4,97	165,38	50668	6,81	4
70kd Heat Shock Cognate Protein Atpase Domain, K71m Mutant	gil1943515	6,36	167,24	41917	9,45	3
keratin 8, type II cytoskeletal - human	gil105815	5,36	127,96	53715	8,70	4
Tat-SF1 [Homo sapiens]	gil1667611	4,29	165,74	85708	4,24	4
DDX17 protein [Homo sapiens]	gil12653635	8,82	160,46	72326	4,92	3
heat shock protein 90-beta [validated] - human	gil72222	4,97	125,15	83242	5,39	3
FYVE and coiled-coil domain containing 1; RUN and FYVE domain containing 3 [Homo sapiens]	gil13470092	4,85	132,11	166891	1,35	2
nuclear corepressor KAP-1 [Homo sapiens]	gil1699027	5,52	93,10	88479	5,99	3
fatty-acid synthase (EC 2.3.1.85) (version 2) - human	gil7433799	5,98	100,57	272919	1,43	3
unnamed protein product [Homo sapiens]	gil31092	9,10	125,36	50095	9,31	3
ubiquitin - Mediterranean fruit fly	gil70637	6,56	102,25	8446	33,78	2
adaptor-related protein complex 2, alpha 2 subunit; alpha-adaptin C;	gil27477041	6,53	88,92	103895	2,24	2

Huntingtin interacting protein

structure specific recognition protein 1; recombination signal sequence
recognition protein; chroma

PL10 protein [Mus musculus]

Unknown (protein for IMAGE:4110141) [Homo sapiens]

adaptor-related protein complex 2, beta 1 subunit; adaptin, beta 2 (beta); clathrin-associated/asse

Coatamer alpha subunit (Alpha-coat protein) (Alpha-COP) (HEPCOP)
(HEP-COP) [Contains: Xenin (Xenops

RAD50 homolog isoform 2; RAD50 (S. cerevisiae) homolog [Homo sapiens]

Vpr-binding protein [Homo sapiens]

proline and glutamic acid rich nuclear protein isoform [Homo sapiens]

ATP citrate (pro-S)-lyase - human

M2-type pyruvate kinase

transformation upregulated nuclear protein [Homo sapiens]

solute carrier family 25 member 4; ADP/ATP translocase T1; adenine nucleotide translocator 1 (skele

Bruton's tyrosine kinase-associated protein-135; BAP-135 [Homo sapiens]

dishevelled 2, dsh homolog [Mus musculus]

gil4507241	6,45	109,28	81024	4,65	3
gil14861844	6,74	102,35	73095	3,03	2
gil14043538	7,16	103,27	27580	4,55	2
gil4557469	5,22	78,30	104486	3,52	3
gil2494888	7,70	92,44	138271	1,63	2
gil19924131	6,17	87,24	138346	1,71	2
gil7662316	4,92	83,78	168900	1,19	2
gil3168604	4,22	58,22	109069	1,27	1
gil105392	6,42	72,48	121342	2,08	2
gil189998	7,95	55,75	57877	4,14	2
gil460789	5,13	56,07	51040	2,59	1
gil32189340	9,84	42,85	32946	4,36	1
gil1870688	8,23	49,60	107812	1,25	1
gil6681239	5,68	49,03	78754	3,26	2

description	accession	pl	score	mass	coverage	#peptides
arrestin, beta 2 [Rattus norvegicus]	gi 6978539	7,62	1198,09	45127	49,50	21
keratin 1 [Homo sapiens]	gi 17318569	8,16	852,05	66027	25,47	16
unnamed protein product [Homo sapiens]	gi 28317	5,17	495,99	59492	21,08	11
tubulin, beta 5 [Mus musculus]	gi 7106439	4,78	321,39	49639	25,00	9
heat shock protein	gi 386785	5,42	262,20	69825	10,78	6
Ap3b1 protein [Mus musculus]	gi 15929245	5,43	256,23	123079	4,96	5
beta tubulin [Cricetulus griseus]	gi 537407	4,79	236,35	49716	18,92	7
nuclear corepressor KAP-1 [Homo sapiens]	gi 1699027	5,52	226,96	88479	7,43	5
Trypsin precursor	gi 136429	7,00	218,59	24394	20,78	3
cytokeratin 9 [Homo sapiens]	gi 435476	5,19	175,76	62092	8,03	4
Unknown (protein for MGC:116262) [Rattus norvegicus]	gi 71051822	8,06	162,47	59213	5,62	3
Tubulin alpha 6 [Homo sapiens]	gi 13436317	4,96	158,57	49863	9,35	3
hypothetical protein [Pongo pygmaeus]	gi 55728510	4,31	135,07	85726	5,44	3
Keratin 6B [Homo sapiens]	gi 21961227	8,09	146,91	60030	7,62	4
dishevelled 2 [Homo sapiens]	gi 4758216	5,67	143,99	78899	7,34	4
Hsc70-ps1 [Rattus norvegicus]	gi 56385	5,43	112,50	70884	5,57	3
Myosin light chain kinase 2, skeletal/cardiac muscle (MLCK2)	gi 125493	5,13	97,25	65427	1,81	2
adaptor-related protein complex 2, alpha 2 subunit [Homo sapiens]	gi 27477041	6,53	86,72	103895	3,30	3
growth regulated nuclear 68 protein	gi 226021	8,95	82,52	66881	3,70	2
elongation factor Tu	gi 704416	7,69	77,20	49509	6,86	2
transformation upregulated nuclear protein [Homo sapiens]	gi 460789	5,13	73,51	51040	2,59	1
pyruvate kinase [Homo sapiens]	gi 35505	7,58	70,07	57841	8,47	2
PREDICTED: similar to ADP,ATP carrier protein, heart/skeletal muscle isoform T1 (ADP/ATP translocas	gi 55623576	9,83	69,31	52196	4,89	2
chromatin-specific transcription elongation factor large subunit [Homo sapiens]	gi 6005757	5,50	59,60	119838	1,05	1
peptidoglycan recognition protein [Bos taurus]	gi 27808640	9,59	59,12	21050	12,63	2
Ig mu chain C region, membrane-bound form - rabbit	gi 70045	5,54	58,30	52318	5,43	2
Ig gamma-2 chain C region (clone 32.2) - bovine (fragment)	gi 89611	8,04	53,74	36020	3,06	1
hypothetical protein [Homo sapiens]	gi 7328151	5,05	51,76	31417	3,53	1
Ig kappa chain b4	gi 165371	5,38	51,66	23298	6,36	1
Bruton's tyrosine kinase-associated protein-135; BAP-135 [Homo sapiens]	gi 1870688	8,23	44,76	107812	0,94	1
gamma non-muscle actin [Oryctolagus cuniculus]	gi 1703	5,30	42,50	41729	4,27	1
heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F [Homo sapiens]	gi 4826760	5,38	37,76	45643	4,10	1
skeletal muscle LIM-protein SLIM	gi 1381814	8,52	31,21	16714	8,00	1

phospholipase C-beta 3 - rat (fragment)	gil423977	5,61	27,94	137639	0,82	1
PREDICTED: similar to arrestin 3, retinal (X-arrestin) [Canis familiaris]	gil74007696	5,84	27,93	45391	5,85	1
Ig gamma H-chain C-region [Oryctolagus cuniculus]	gil457366	8,29	24,68	35270	5,28	1

ANNEXE C

Rabiet, M.J., Huet, E. and Boulay, F. (2005)

***Eur. J. Immunol.*, 35, 2486-2495**

**Human mitochondria-derived N-formylated peptides
are novel agonists equally active on FPR and
FPRL1, while *Listeria monocytogenes*-derived
peptides preferentially activate FPR**

Human mitochondria-derived N-formylated peptides are novel agonists equally active on FPR and FPRL1, while *Listeria monocytogenes*-derived peptides preferentially activate FPR

Marie-Josèphe Rabiet, Emilie Huet and François Boulay

CEA Grenoble, Département de Dynamique et Réponse Cellulaires, Laboratoire de Biochimie et de Biophysique des Systèmes Intégrés, UMR 5092 CEA/CNRS/Université Joseph Fourier, Grenoble, France

N-formyl peptides are cleavage products of bacterial and mitochondrial proteins, and can attract leukocytes to sites of infection or tissue damage. In this study, HL-60 cell lines expressing the human *N*-formyl peptide receptor FPR or its two homologues (FPRL1, FPRL2) were used to determine the receptor selectivity of *N*-formylated peptides derived from *Listeria monocytogenes* or from human mitochondrial proteins. Bacterial peptides were 100-fold more potent on FPR than on FPRL1, whereas none of them could trigger intracellular signaling through FPRL2. In contrast, *N*-formylated hexapeptides corresponding to the N terminus of mitochondrial NADH dehydrogenase subunits 4 (fMLKLIV) and 6 (fMMYALF), and cytochrome c oxidase subunit I (fMFADRW) were equally potent on FPR and FPRL1. They triggered cellular responses with the following order of potency: fMMYALF > fMLKLIV > fMFADRW, with an EC₅₀, in a Fura-2 calcium mobilization assay, of 10 nM, 44 nM, and 160 nM on FPR-expressing cells, and 15 nM, 55 nM and 120 nM on FPRL1-expressing cells. fMMYALF was also a low-affinity agonist of FPRL2 (EC₅₀ of 1 μM) and was chemotactic for both FPRL1- and FPRL2-expressing cells. We identified novel mitochondrial host-derived agonists for human *N*-formyl-peptide receptors that might play a role in inflammatory or degenerative processes linked to their stimulation.

Received 24/4/05

Accepted 20/6/05

[DOI 10.1002/eji.200526338]

Key words:

Human · Neutrophils
· Chemotaxis
· Inflammation
· Signal transduction

Introduction

Phagocytic leukocytes play an important role in host defense against microbial agents. Leukocyte recruitment at the site of infection is dependent on the presence of a gradient of chemotactic factors. Invading bacteria release short *N*-formylated peptides into local tissues.

Correspondence: Marie-Josèphe Rabiet, Commissariat à l'Energie Atomique Grenoble, Département de Dynamique et Réponse Cellulaires, Laboratoire de Biochimie et de Biophysique des Systèmes Intégrés (UMR 5092 CEA/CNRS/Université Joseph Fourier), 17 rue des Martyrs, 38054 Grenoble Cedex 9, France
Fax: +33-438-78-51-85
e-mail: mjrabiet@cea.fr

These *N*-formylated peptides, such as the *Escherichia coli*-derived *N*-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine (fMLF), are considered as “classical” chemoattractants. Like other chemoattractants, including the activated complement component 5 (C5a), platelet-activating factor (PAF), leukotriene B₄ (LTB₄) and a superfamily of chemokines, they activate seven-transmembrane-domain G_i protein-coupled receptors (GPCR) [1–3] present on phagocytic cells and other cell types. The binding of chemoattractants to their receptors on phagocytic cells causes calcium mobilization, activation of the NADPH oxidase, and the release of the content of granules. The subsequent release of free oxygen radicals and lysosomal enzyme secretion participate to the clearance of bacteria [4].

In humans, the *N*-formyl peptide receptor (FPR) has two homologues referred to as *N*-formyl peptide receptor-like 1 (FPRL1) and *N*-formyl peptide receptor-like 2 (FPRL2) [5]. The *N*-formylated peptide fMLF is the smallest peptide that binds to FPR ($K_d < 40$ nM) triggering cellular responses in human neutrophils at low nanomolar concentrations [6]. The *N*-formyl group was determined as a crucial determinant of ligand binding to FPR [7], although several works have revealed the high potency of non-formylated pentapeptide analogs [8]. FPRL1 is defined as a low-affinity receptor for the FPR agonists, activated only by concentrations of fMLF in the micromolar range [9]. The first ligand shown to bind with high affinity (low nanomolar range) to this receptor was lipoxin A4 (LXA4), an anti-inflammatory lipid mediator [10]. Recently, FPRL1 has emerged as a promiscuous receptor, also activated by the pathogen-derived peptide Hp(2–20) from *Helicobacter pylori*, by host-derived proteins and peptides such as Ac1–25 from annexin 1, cathelicidin LL37, a fragment of the urokinase receptor, the serum amyloid A, the amyloid β peptide (A β 42), the prion protein fragment PrP(106–126), the neuroprotective peptide humanin, and by different synthetic peptides including the hexapeptide Trp-Lys-Tyr-Met-Val-D-Met-NH₂ (WKYMVm) [11, 12]. FPRL2 does not respond to fMLF [13], but instead is activated by some non-formylated chemotactic peptides identified as agonists for FPRL1 [14, 15]. Recently, an acetylated *N*-terminal peptide derived from the human heme-binding protein has been identified as a ligand specific for FPRL2 [16].

Bacterial and mitochondrial proteins are the only source of *N*-formyl peptides in nature. It is widely thought that the *N*-formyl peptide receptors have evolved to mediate phagocyte migration to sites of bacterial invasion or tissue injury. This is supported by the ability of *N*-formyl peptides to induce the production of superoxide ions and the release of anti-microbial peptides from phagocytes, and by the reduced resistance of FPR knockout mice to infection by *Listeria monocytogenes* [17]. Accumulation of phagocytes at sites of tissue injury may result from cell lysis and release of mitochondrial peptides. Using disrupted mitochondria, prepared from cultured human cells, or mitochondrial proteins, Carp [18] showed that both of these preparations can attract neutrophils *in vitro*.

In the present work, we screened a collection of *N*-formylated synthetic peptides, comprising peptides from *L. monocytogenes* and peptides corresponding to human mitochondrial proteins, for their ability to trigger calcium mobilization, intracellular signaling and cellular responses in promyelocytic HL-60 cell lines stably expressing either FPR, FPRL1 or FPRL2. These transfected cells were invaluable tools to investigate the receptor specificity of the peptides.

Results

Identification of *N*-formylated peptides from *L. monocytogenes* and from human mitochondria that stimulate calcium mobilization on FPR-, FPRL1- or FPRL2-expressing HL-60 cells

HL-60 cell lines stably expressing either the *N*-formyl peptide receptor FPR (HL-60-FPR cells) or each of its homologues, FPRL1 (HL-60-FPRL1 cells) and FPRL2 (HL-60-FPRL2 cells), were used to determine the receptor selectivity of four *N*-formylated peptides that derived from *L. monocytogenes* and to screen 13 peptides derived from human proteins encoded by the mitochondrial genome (NADH dehydrogenase, cytochrome c oxidase, cytochrome b, and ATP synthase). The sequences of these peptides are presented in Table 1. Peptides were assayed for their ability to trigger intracellular calcium increase through the activation of each member of the FPR subfamily. As illustrated in Fig. 1A, among the four *N*-formylated peptides derived from *L. monocytogenes*, two peptides, fMIVIL and fMIVTLF, were identified as very potent agonists of FPR with an EC₅₀ in the low nanomolar range (2.2 nM

Table 1. Synthetic *N*-formyl peptides used in this communication^{a)}

Sequence	Origin
<i>L. monocytogenes</i> peptides	
Formyl-MIVIL	<i>L. monocytogenes</i>
Formyl-MIVTLF	<i>L. monocytogenes</i>
Formyl-MIGWII	<i>L. monocytogenes</i>
Formyl-MIGWI	<i>L. monocytogenes</i>
Mitochondrial peptides	
Formyl-MPMANL	ND1
Formyl-MNPLAQ	ND2
Formyl-MNFALI	ND3
Formyl-MPLIYM	ND4L
Formyl-MLKLIV	ND4
Formyl-MTMHTT	ND5
Formyl-MMYALF	ND6
Formyl-MFADRW	CoxI
Formyl-MAHAAQ	CoxII
Formyl-MTHQSH	CoxIII
Formyl-MTPMRK	Cytochrome b
Formyl-MNENLF	ATP synthase subunit 6
Formyl-MPQLNT	ATP synthase subunit 8

^{a)} ND: NADH dehydrogenase subunit, Cox: cytochrome c oxidase subunit.

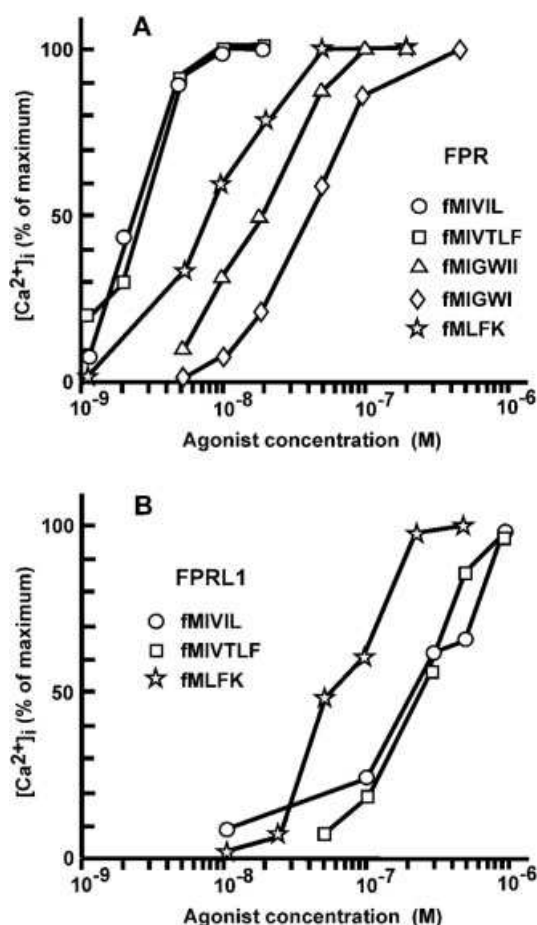


Fig. 1. Dose response curves of intracellular calcium mobilization triggered by *L. monocytogenes* peptides (fMIVIL, fMIVTLF, fMIGWII and fMIGWI) in HL-60 cells expressing FPR or FPRL1. Cells were loaded with 2 μ M Fura-2 and analyzed with respect to the rise in intracellular calcium mediated by peptide application. In (A), the $[Ca^{2+}]_i$ increases (peak value in % of the maximal response) induced by different concentrations of fMIVIL (circles), fMIVTLF (squares), fMIGWII (triangles), fMIGWI (diamonds) and the classic FPR agonist fMLFK (stars) are shown for H-60-FPR cells. In (B), the $[Ca^{2+}]_i$ increases induced by different concentrations of fMIVIL (circles), fMIVTLF (squares), and fMLFK (stars) are shown for HL-60-FPRL1 cells. Intracellular calcium mobilization was undetectable in HL-60-FPRL1 cells for peptides fMIGWII and fMIGWI even at the concentration of 1 μ M. The curves are from a representative experiment.

and 2.7 nM, respectively). These two peptides were 3- to 4-fold more potent than the classic FPR agonist fMLFK (EC₅₀ 8 nM), whereas the *N*-formylated peptides fMIGWI and fMIGWII were less potent than fMLFK for FPR activation (EC₅₀ 20 nM and 40 nM, respectively). The peptides fMIVIL and fMIVTLF turned out to be 100-fold less potent on FPRL1 than on FPR, as shown in Fig. 1B, whereas fMIGWI and fMIGWII were inactive on FPRL1 at concentrations lower than 1 μ M. None of the *L. monocytogenes* peptides could trigger calcium mobilization through FPRL2.

Two peptides fMLKLIV and fMMYALF, derived, respectively, from subunit 4 and subunit 6 of human mitochondrial NADH dehydrogenase, as well as one peptide derived from subunit 1 of cytochrome c oxidase were identified as agonists that triggered changes in cytosolic calcium concentration through either FPR or FPRL1 (Fig. 2A, B). These peptides activated FPR with the following order of potency: fMMYALF > fMLKLIV > fMFADRW (EC₅₀ at around 12 nM, 45 nM, and 160 nM, respectively). There were almost as active on FPRL1 with EC₅₀ at around 15 nM, 55 nM, and 210 nM, respectively. Among these peptides, only fMMYALF was able to induce intracellular calcium increase through FPRL2 activation, albeit at high concentration (EC₅₀ ~ 1 μ M) (Fig. 2C). Table 2 summarizes the biological activities of the seven active peptides on the different cell transfectants.

MAP kinase activation by *L. monocytogenes* peptides and mitochondrial peptides in HL-60 cells expressing FPRL1 or FPRL2

Many reports have demonstrated that chemoattractants stimulate extracellular signal-regulated protein kinases (ERK1/2) activity. In the present study, provided that appropriate concentrations were used, all peptides active in the calcium mobilization assay also caused a dramatic increase in the phosphorylation level of ERK1/2 in HL-60 cells expressing FPR (Fig. 3A), FPRL1 (Fig. 3B) or FPRL2 (Fig. 3C). In HL-60-FPR and HL-60-FPRL1 cells, the extent of *L. monocytogenes* and mitochondrial peptide-induced ERK1/2 phosphorylation was comparable to that elicited by the FPR agonist fMLFK and the FPRL1 agonist WKYMVm, respectively. In HL-60-FPRL2 cells, even at high concentration (1 μ M), only the NADH dehydrogenase subunit 6-derived peptide fMMYALF was able to induce a substantial ERK1/2 phosphorylation.

Chemotactic effect of the NADH dehydrogenase subunit 6-derived peptide fMMYALF, on HL-60 cells expressing FPRL1 or FPRL2

Because the NADH dehydrogenase subunit 6-derived peptide fMMYALF is an agonist that more efficiently activates FPRL1 than FPRL2 in the calcium mobilization and ERK1/2 phosphorylation assays, we studied the effect of this peptide on more distal cellular functions. Thus, we examined the ability of fMMYALF to elicit the migration of HL-60-FPRL1 and HL-60-FPRL2 cells, through 3- μ m pores, into a chamber containing various concentrations of peptide ranging from 1 nM to 10 μ M. As illustrated in Fig. 4, cells expressing FPRL1 migrated in a bell-shape dose-dependent manner. Maximal migration was observed at 1 μ M fMMYALF. Cells

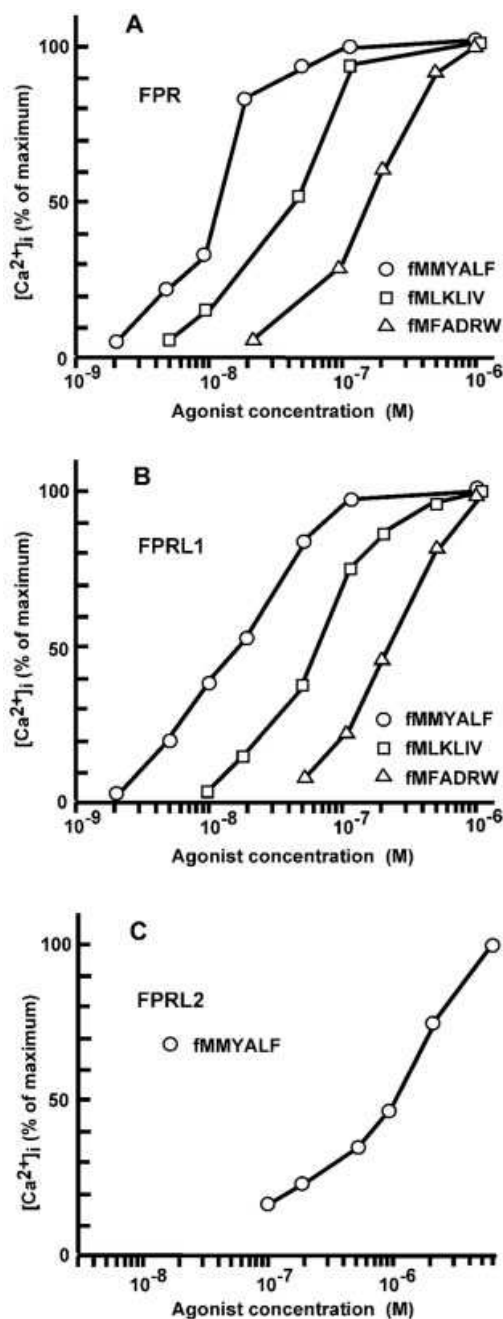


Fig. 2. Dose-response curves of intracellular calcium mobilization triggered by peptides derived from three human mitochondrial proteins (NADH dehydrogenase subunits 4 and 6, and cytochrome c oxidase subunit I) in HL-60 cells expressing FPR, FPRL1 or FPRL2. Cells were loaded with $2 \mu\text{M}$ Fura-2 and analyzed with respect to the rise in intracellular calcium mediated by peptide application. In (A), the $[Ca^{2+}]_i$ increases (peak value in % of the maximal value) induced by different concentrations of the N-terminal hexapeptides from NADH dehydrogenase subunit 6, fMMYALF (circles), NADH dehydrogenase subunit 4, fMLKLIV (squares), and cytochrome c oxidase subunit I, fMFADRW (triangles) are shown for HL-60-FPR cells. In (B), the $[Ca^{2+}]_i$ increases induced by different concentrations of the same peptides are shown for HL-60-FPRL1 cells. In (C), the $[Ca^{2+}]_i$ increases induced by different concentrations of fMMYALF are shown for HL-60-FPRL2 cells. The curves are from a representative experiment.

expressing FPRL2 responded to the peptide in terms of migration. However, high concentrations of peptide were necessary and no bell shape curve was obtained in the range of concentrations used. Thus, the *N*-formylated mitochondrial human peptide fMMYALF is chemotactic for *N*-formyl peptide receptor-expressing cells. This mitochondrial peptide, released from mitochondria at sites of tissue damage, might play a role in the accumulation of inflammatory cells observed at these sites.

Effect on superoxide generation of the most active peptides derived from *L. monocytogenes* and mitochondria

Superoxide generation by phagocytes is one of the important steps in the host defense mechanism. We tested the effect of the peptides found to be the most active on *N*-formyl peptide receptor-expressing cells on superoxide generation in HL-60 cells differentiated into neutrophil-like cells. Differentiated HL-60 cells express both FPR and FPRL1. *L. monocytogenes* peptide fMIVIL (Fig. 5) and peptide fMMYALF from NADH dehydrogenase subunit 6 (Fig. 6A) were found to stimulate superoxide generation in a concentration-dependent manner. In the case of the mitochondrial peptide fMMYALF, the EC_{50} was in the same range as that observed with the calcium mobilization assay. However, for *L. monocytogenes* peptide fMIVIL, the EC_{50} for superoxide production was consistently higher than that observed with calcium measurements (15 nM vs 2.2 nM). A similar difference between the EC_{50} measured by calcium mobilization and superoxide production assays has also been observed in the case of the synthetic peptide WKYMVm [19]. Accordingly, Waller et al. [6], studying receptor binding kinetics and cellular responses of several *N*-formyl peptide agonists in human neutrophils, have shown that the EC_{50} for G-protein activation, in a $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ -binding assay, were two to three orders of magnitude greater than the corresponding EC_{50} for actin polymerization and superoxide production assays. It was suggested that the differences in the abilities of ligands to mediate responses were determined upstream of G-protein activation at the level of ligand-receptor interactions and that post-receptor events contributed to the amplification of the responses. Activation of the superoxide generating NADPH oxidase results from a complex array of intracellular signaling pathways that may be less efficiently triggered by fMIVIL and WKYMVm.

Cyclosporin H (CsH), a potent FPR receptor antagonist [20], was tested for its ability to inhibit the respiratory burst elicited by the peptides. As illustrated in Fig. 5, CsH totally blocked the response induced by *L. monocytogenes* peptide fMIVIL, whereas, in

Table 2. Biological activities of the seven active peptides in HL-60 cell lines stably expressing FPR, FPRL1 or FPRL2^{a)}

Peptide		HL-60-FPR EC ₅₀ (M) in a Fura-2 calcium mobilization assay	HL-60-FPRL1	HL-60-FPRL2
<i>L. monocytogenes</i> peptides				
fMIGWI		2.0×10^{-8}	2.1×10^{-7}	inactive
fMIVIL		2.2×10^{-9}	1.6×10^{-7}	inactive
fMIVTLF		2.7×10^{-9}	2.0×10^{-7}	inactive
fMIGWII		4.0×10^{-8}	inactive	inactive
Mitochondrial peptides				
ND4	fMLKLIV	4.5×10^{-8}	5.5×10^{-8}	inactive
ND6	fMMYALF	1.2×10^{-8}	1.5×10^{-8}	1.0×10^{-6}
CoxI	fMFADRW	1.6×10^{-7}	2.1×10^{-7}	inactive

the case of the mitochondrial peptide fMMYALF, CsH had an inhibitory effect on superoxide production for peptide concentrations lower than 100 nM (Fig. 6A). The robust superoxide response observed at high concentrations of fMMYALF peptide in the presence of CsH most likely corresponds to the effect of the peptide on FPRL1, a receptor which is unaffected by CsH. Indeed, CsH had no effect on the respiratory burst elicited by the synthetic hexapeptide WKYMVm, an agonist that preferentially activates myeloid cells through FPRL1 (Fig. 6B).

Discussion

Leukocytes accumulate at sites of microbial infection or tissue damage in direct response to locally produced chemotactic factors. Numerous chemoattractants, of bacterial, viral or endogenous origin, have been identified over the past decade [11]. All these agonists act through seven-transmembrane domain receptors of which the FPR is the most prominent. The first identified and most investigated FPR ligands, the *N*-formylated peptides, originate from exogenous sources such as the proteins of invading pathogens and have been shown to be powerful attractants for mammalian phagocytes to infected tissue. The two other human *N*-formyl peptide receptors, FPRL1 and FPRL2, share 69% and 56% amino acid identity with FPR, respectively [3]. FPRL1 and FPR are expressed in phagocytic cells and also in other cell types including hepatocytes, dendritic cells and cells of the nervous system [11, 13]. FPRL2 expression is restricted to cells of myeloid origin including monocytes, macrophages, and dendritic cells. However, it is not detectable in neutrophils [13, 21]. The targeted disruption of the murine FPR gene provided definitive evidence for the involvement of FPR in host defense against microbial invasion [17]. The role of FPRL1 and

FPRL2 as functional receptors for *N*-formyl peptides of exogenous origin, and their importance in anti-microbial host defense *in vivo*, are still unclear. The increased susceptibility to infection with *L. monocytogenes*, attributed to the lack of FPR in knockout mice, was not compensated by the presence of the other murine *N*-formyl peptide receptors [17].

Agonists of the *N*-formyl peptide receptors are potent activators of the NADPH oxidase, an enzyme complex responsible for the production and release of superoxide anion. This very reactive molecule is rapidly converted to hydrogen peroxide and other toxic oxygen species [22]. Deleterious for pathogens, they are also damaging to the host itself. At the site of inflammation, phagocytic cells can thus be attracted not only by the peptides produced by invading microorganisms, but also by host-derived peptides. The mitochondrial proteins of ruptured host cells can be the source of *N*-formylated peptides that can act as chemoattractants for leukocytes. Rodent mitochondrial peptides have been shown to attract and activate neutrophils [23, 24]. In addition, many host-derived non-*N*-formylated peptides have been reported to interact with FPRL1. They include the serum amyloid A, an acute-phase protein, and the peptide A β 42 from the β amyloid precursor molecule, suggesting a role for FPRL1 in the inflammatory responses and tissue damage associated with amyloidosis, and in the neurodegenerative process of Alzheimer's disease [11, 25]. Cell activation may promote an oxidative response potentially destructive to neuronal cells, contributing to the degeneration and possible loss of neurons.

In this study, we tested a selection of peptides from bacterial origin (*L. monocytogenes*) or from endogenous origin (human mitochondria) for their ability to stimulate the human *N*-formyl peptide receptors, FPR and its two homologues FPRL1 and FPRL2. Each one of these receptors was stably expressed in HL-60 cells, a

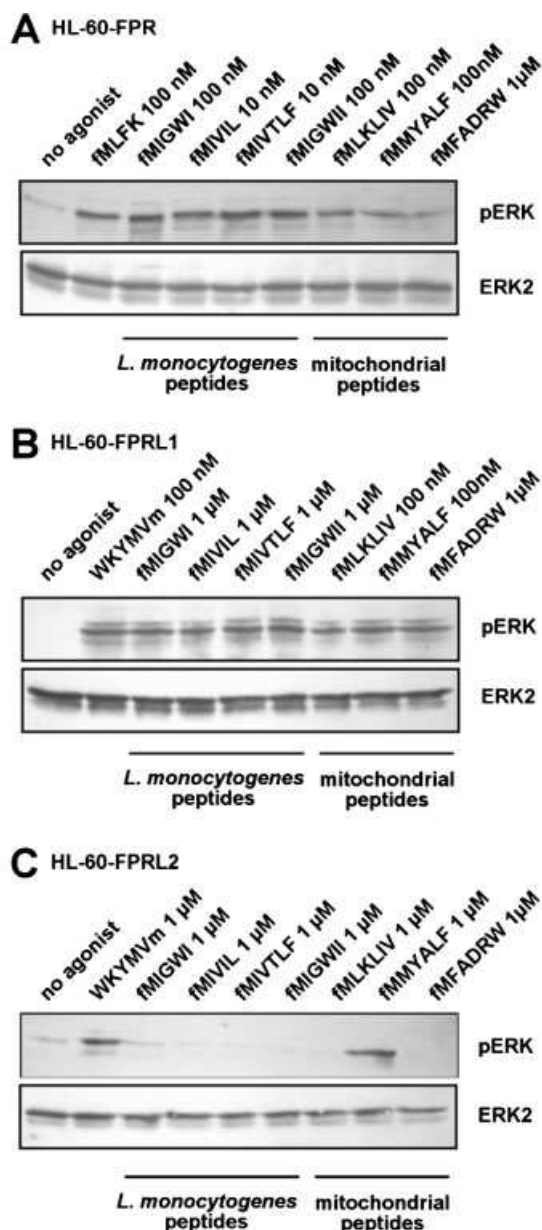


Fig. 3. Activation of the MAP kinase pathway in HL-60 cells expressing FPR, FPRL1 or FPRL2. Peptide-stimulated ERK1/2 phosphorylation was examined in lysates of undifferentiated HL-60-FPR cells (A), HL-60-FPRL1 cells (B), or HL-60-FPRL2 cells (C) after stimulation for 30 s with each peptide at the indicated concentrations or with vehicle alone. Each sample was subjected to SDS-PAGE and phosphorylated ERK1/2 was identified by immunoblot analysis with anti-phospho-ERK antibody. Western blot analysis performed with an anti-ERK2 antibody confirmed that the amounts of protein loaded were similar.

cell line of myeloid origin that does not express these receptors when undifferentiated [14]. The transfected cells were used to investigate the receptor specificity of the peptides. All the peptides were *N*-formylated and thus complied to the major structural requirements for binding to FPR. Out of the 17 peptides tested, 7 were

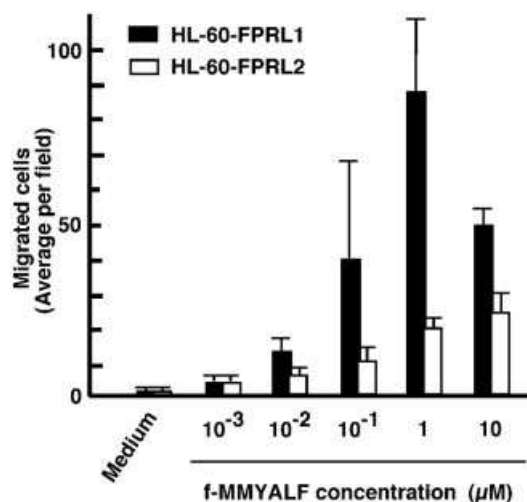


Fig. 4. Chemotactic activity of the human mitochondrial peptide f-MMYALF on HL-60 cells expressing FPRL1 or FPRL2. The migration of undifferentiated HL-60-FPRL1 cells (black bars) and HL-60-FPRL2 cells (white bars) towards various concentrations of the peptide was quantified as described in the Material and methods section. Values are the means \pm SD of four experiments.

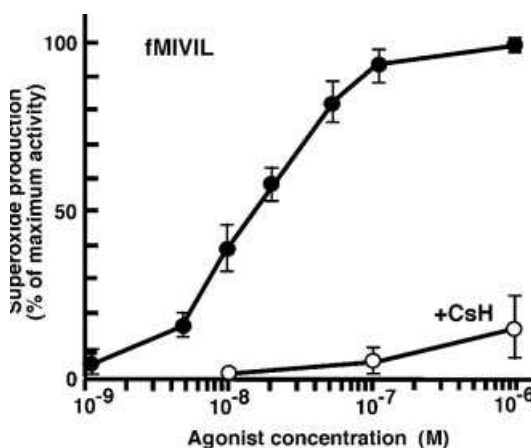


Fig. 5. NADPH oxidase activity induced by the formyl peptide fMIVIL from *L. monocytogenes* on neutrophil-like differentiated HL-60 cells. HL-60 cells were differentiated into neutrophil-like cells with Bt_2cAMP . Differentiated HL-60 cells were incubated with (open symbols) or without (filled symbols) CsH (1 μ M) for 5 min, before being stimulated with different concentrations of fMIVIL peptide. Ferricytochrome C reduction was continuously recorded at 550 nm. The respiratory burst activity is expressed in percentage of the activity induced by 1 μ M fMIVIL peptide in the absence of CsH. Values represent the mean value (\pm SD) calculated from three experiments.

able to induce intracellular signals, such as calcium mobilization and ERK1/2 phosphorylation, via FPR and FPRL1. Peptides from *L. monocytogenes* were found to be more effective in stimulating intracellular calcium increase in HL-60-FPR cells than in HL-60-FPRL1 cells. Moreover, none of them were able to stimulate FPRL2-

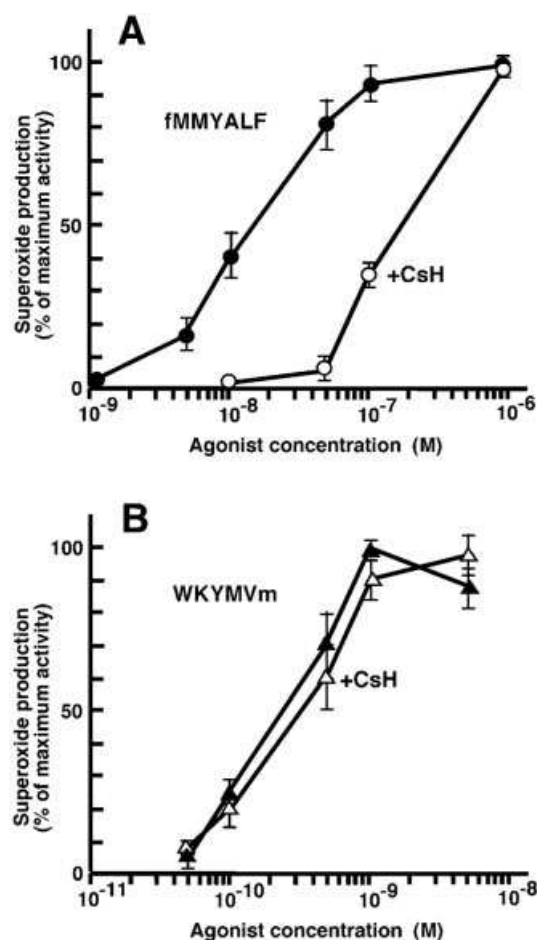


Fig. 6. NADPH oxidase activity induced by the mitochondrial peptide fMMYALF from NADH dehydrogenase subunit 6 on neutrophil-like differentiated HL-60 cells. HL-60 cells were differentiated into neutrophil-like cells with Bt₂cAMP. Differentiated HL-60 cells were incubated with (open symbols) or without (filled symbols) CsH (1 μ M) for 5 min, before being stimulated with different concentrations of fMMYALF (A) or WKYMVm (B). Ferricytochrome C reduction was continuously recorded at 550 nm. The respiratory burst activity is expressed in percentage of the activity induced by 1 μ M fMMYALF or 1 nM WKYMVm, in the absence of CsH. Values represent the mean value (\pm SD) calculated from four experiments.

expressing cells. Thus, FPR might play a more important role than FPRL1 and FPRL2 in host defense against microbial infection.

The mouse MHC class Ib antigen-presenting molecule, H2-M3, also has a preferential requirement for *N*-formylated ligands, and presents *N*-formylated peptides derived from pathogenic organisms to cytolytic T lymphocytes, which mediate both specific clearance of primary infections and memory immune responses [26–28]. A number of *N*-formylated peptides identified as ligands of H2-M3, originating from *L. monocytogenes* [29–31] and from the N terminus of mouse mitochondrial proteins [32], have been shown to be chemotactic and to activate rabbit neutrophils *in vitro* [23]. They

were thus postulated to use *N*-formyl peptide receptors. A nonamer of the rat form of ND1 (*N*-formyl-MYFINILTL), which binds to MHC class Ib molecule H2-M3 [33], has been shown to stimulate neutrophil chemotaxis and to compete for binding of [³H]lipoxin A4 (LXA4) to LXA4R/FPRL1 expressed in HEK293 cells [34]. However, in our hands, the hexapeptide that derived from the human form of ND1 was inactive on the human members of the FPR family.

The *L. monocytogenes* peptides tested in our study for their specificity towards *N*-formyl peptide receptors have been identified as peptides bound to the mouse H2-M3 molecule. The peptide fMIVIL was identified by tandem mass spectrometry of *L. monocytogenes* bacterial culture supernatants [30]. The protein from which the peptide is derived has not yet been identified, but is probably secreted by the bacteria. The peptides fMIGWII and fMIVTLF were identified as active peptides in screening of *L. monocytogenes* genomic libraries for the production of antigenic activity and for the ability to sensitize target cells to lysis [29, 31]. The protein LemA, a bacterial membrane protein, was identified as the source of the fMIGWII peptide. Thus, peptides that are potent agonists for chemoattractant receptors are also the major bacterial antigens in the defensive immune response to infection in mice.

We identified three *N*-formylated peptides derived from human mitochondrial proteins as potent FPR and FPRL1 agonists. In contrast to *L. monocytogenes* peptides, they are equally potent on both receptors. A mitochondrial *N*-formyl peptide derived from murine NADH dehydrogenase subunit 1 (ND1) has been found to be a chemotactic agonist for rabbit neutrophils [23]. This murine peptide was also found to bind to a non-classic MHC class I molecule and can be displaced by *N*-formyl peptides derived from subunits ND4 and ND5 [35]. In our study, the human ND1 peptide counterpart, which exhibits a totally unrelated sequence, was unable to elicit any effect through either FPR or FPRL1. Instead, *N*-formylated peptide fragments from two other NADH dehydrogenase subunits (ND4 and ND6), which have no homology with the mouse counterparts, were found to induce cellular responses through FPR and FPRL1. The peptide derived from ND6, fMMYALF was also able to trigger intracellular signaling in FPRL2-expressing cells and to be chemotactic for these cells. We thus identified this *N*-formylated peptide of mitochondrial origin as a novel low-affinity agonist for FPRL2, a receptor which was, so far, considered as refractory to activation by *N*-formylated peptides. There are already a few FPRL1 ligands, such as peptides derived from the bacteria *H. pylori* [15] and the human neuroprotective factor, humanin [12], which also binds FPRL2 with low affinity. Interestingly, the *N*-formylated form of humanin was found to perform more potently as a ligand for FPRL1

than non-formylated humanin, and to be chemotactic for CHO cells expressing FPRL1 or FPRL2 [36]. The third mitochondrial peptide that we identified as an agonist for FPR and FPRL1 is an *N*-formylated peptide derived from the cytochrome *c* oxidase subunit 1. The corresponding murine peptide has been identified as a minor histocompatibility antigen that binds to and is presented by H2-M3 [37].

Since the identification and molecular cloning of the *N*-formyl peptide receptor [2] and its homologues [1, 3] a decade ago, their pathophysiological role has broadened beyond host resistance against exogenous pathogens. In particular, the usage of FPRL1 and FPRL2 by host-derived agonists suggests that these receptors may play a crucial role in the regulation of the inflammatory processes associated with tissue damage and neurodegenerative diseases.

Material and methods

Peptides

The *L. monocytogenes* and human mitochondrial peptides were synthesized and purified by high-performance liquid chromatography (HPLC) by Resgen (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) and kindly provided by Prof. Francis Loor (University Louis Pasteur, Strasbourg, France). The hexapeptide WKYMVm was synthesized and HPLC-purified by Neosystem (Strasbourg, France). fMLFK was purchased from Sigma Chemical CO (St Louis, MO). Peptides were dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO) to 2 mM and stored at -20°C until used. Subsequent dilutions of all peptides were made in DMSO.

Stable expression of FPR, FPRL1 and FPRL2 in HL-60 cells

The construction of the expression plasmids and the stable expression of FPRL1 and FPRL2 in undifferentiated HL-60 cells have been previously described [14, 19]. Both cell lines gave an intracellular calcium response peaking at 400–600 nM after stimulation with 1 μM of the hexapeptide WKYMVm. The cDNA encoding FPR (clone FPR26) [2] was cloned into the pEFneo plasmid cleaved by XbaI. Transfection of HL-60 cells was performed as previously described [38]. A stable clone was selected that responded to fMLFK in the calcium mobilization assay with an amplitude of the response between 500 and 600 nM $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Cells were cultured in RPMI 1640 medium/glutamax I (Invitrogen) supplemented with 100 U/mL penicillin, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ streptomycin, 1 mg/mL G418, and 10% fetal bovine serum. The maximal density was maintained below 2×10^6 cells/mL. Cells were centrifuged and the cell pellet was suspended in fresh medium at each passage.

Determination of changes in cytosolic calcium in HL-60 cells expressing FPR, FPRL1 or FPRL2

HL-60 cells were washed with phosphate-buffered saline (PBS). The cell pellets were resuspended at a density of 2×10^7 cells/mL in RPMI medium without phenol red containing 0.1% bovine serum albumin (BSA) and loaded with 2 μM Fura 2-AM (Molecular Probes, Eugene, OR) for 30 min, at 37°C . Cells were then diluted with two volumes of the same medium without BSA, washed once in Krebs-Ringer phosphate buffer, pH 7.3, containing 10 mM glucose, 1 mM CaCl_2 , and 1.5 mM MgCl_2 , and resuspended in RPMI medium without phenol red at a density of 2×10^7 cells/mL. Calcium measurements were carried out in a SPEX FluoroMAX fluorescence spectrophotometer with an excitation wavelength of 340 nm, an emission wavelength of 505 nm and slit widths of 5 and 10 nm, respectively. Intracellular free calcium concentrations were calculated as: $[\text{Ca}^{2+}]_i = K_d(F - F_{\min}) / (F_{\max} - F)$ with a K_d for Fura-2 of 224 nM; F_{\max} is the fluorescence in the presence of 0.125% Triton X-100 and F_{\min} the fluorescence obtained after addition of 5 mM EGTA plus 30 mM Tris-HCl, pH 7.4.

ERK1/2 phosphorylation

Cell lysates were prepared from FPR-, FPRL1-, or FPRL2-expressing HL-60 cells stimulated for 30 s with the different peptides to the indicated final concentrations. Proteins were resolved by electrophoresis on 10% SDS-PAGE and transferred to a nitrocellulose membrane. The phosphorylation of the ERK1/2 as detected using an anti-phosphoERK mAb (E4, Santa Cruz Biotechnology, CA), Immunoblot analysis with polyclonal anti-ERK2 antibody (C14, Santa Cruz Biotechnology) was performed to confirm that the same amounts of proteins were loaded. Antigen-antibody complexes were visualized after incubating the membrane with goat anti-mouse IgG or goat anti-rabbit IgG antibody coupled to horseradish peroxidase using an enhanced chemiluminescence detection system (Amersham Biosciences, Amersham, UK).

Chemotaxis assay

The chemotaxis assay was performed as previously described [14]. In brief, undifferentiated HL-60 cells stably expressing either FPRL1 or FPRL2 were centrifuged, resuspended in fresh culture medium (10^6 cells/mL), and incubated overnight with 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindolcarbocyanine perchlorate (Molecular probes, Eugene, OR). Cells were centrifuged and washed once with culture medium and twice with chemotaxis buffer (RPMI supplemented with 1% BSA and 20 mM HEPES, pH 7.5). Cells (2×10^5 cells in 100 μL chemotaxis buffer) were loaded into the upper chamber of FluoroBlok inserts of 3- μm pore size (Becton Dickinson, Le Pont-de-Claix, France). The fMMYALF peptide (at different concentrations in 500 μL chemotaxis buffer) was loaded in the lower chamber. The FluoroBlok inserts were incubated at 37°C , for 5 h. Migrating cells dropped from the filters to the bottom of the lower chamber. They were counted using an inverted fluorescence microscope. In each experiment, ten fields were measured at $\times 200$ magnification. Spontaneous

migration was determined in the absence of chemoattractant in the lower chamber.

HL-60 cells differentiation and superoxide production assay

Cell differentiation was initiated with 1 mM $N^6, O-2'$ -dibutyryl cyclic AMP (Bt₂cAMP) for 3 days. Optimal differentiation was obtained when cells were centrifuged and resuspended at a density of 10^6 cells/mL in fresh culture medium before differentiation was initiated. Superoxide production was assayed as previously described [38]. Cells were washed with PBS and resuspended at a concentration of 4×10^7 cells in RPMI medium without phenol red. Fifty microliters of the cell suspension, kept at room temperature were added to 1 mL of prewarmed PBS containing 1 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 30 mM glucose. Ferricytochrome C (200 μ M) was added and superoxide formation was initiated by the addition of agonist at the indicated concentrations. Ferricytochrome C reduction was continuously monitored at 550 nM. In some experiments, a preincubation with 1 μ M CsH (kindly provided by Novartis Pharma, Basel, Switzerland) was performed at 37°C for 5 min before the addition of ferricytochrome C.

Acknowledgements: This work was supported by grants from the Commissariat à l'Energie Atomique (CEA), Centre national de la Recherche Scientifique (CNRS), and the University Joseph Fourier. E. Moulard-Huet is a recipient of a fellowship from the CEA. We are very grateful to Prof. Francis Loor, University Louis Pasteur in Strasbourg, for providing us with the *N*-formylated peptides.

References

- Murphy, P. M., The molecular biology of leukocyte chemoattractant receptors. *Annu. Rev. Immunol.* 1994. **12**: 593–633.
- Boulay, F., Tardif, M., Brouchon, L. and Vignais, P., The human *N*-formylpeptide receptor. Characterization of two cDNA isolates and evidence for a new subfamily of G-protein-coupled receptors. *Biochemistry* 1990. **29**: 11123–11133.
- Ye, R. and Boulay, F., Structure and function of leukocyte chemoattractant receptors. *Adv. Pharmacol.* 1997. **39**: 221–290.
- Wientjes, F. B. and Segal, A. W., NADPH oxidase and the respiratory burst. *Semin. Cell Biol.* 1995. **6**: 357–365.
- Murphy, P. M., Ozcelik, T., Kenney, R. T., Tiffany, H. L., McDermott, D. and Francke, U., A structural homologue of the *N*-formyl peptide receptor. Characterization and chromosome mapping of a peptide chemoattractant receptor family. *J. Biol. Chem.* 1992. **267**: 7637–7643.
- Waller, A., Sutton, K. L., Kinzer-Ursem, T. L., Absood, A., Traynor, J. R., Linderman, J. J. and Omann, G. M., Receptor binding kinetics and cellular responses of six *N*-formyl peptide agonists in human neutrophils. *Biochemistry* 2004. **43**: 8204–8216.
- Freer, R. J., Day, A. R., Radding, J. A., Schiffmann, E., Aswanikumar, S., Showell, H. J. and Becker, E. L., Further studies on the structural requirements for synthetic peptide chemoattractants. *Biochemistry* 1980. **19**: 2404–2410.
- Gao, J. L., Becker, E. L., Freer, R. J., Muthukumaraswamy, N. and Murphy, P. M., A high potency nonformylated peptide agonist for the phagocyte *N*-formylpeptide chemotactic receptor. *J. Exp. Med.* 1994. **180**: 2191–2197.
- Ye, R. D., Cavanagh, S. L., Quehenberger, O., Prossnitz, E. R. and Cochrane, C. G., Isolation of a cDNA that encodes a novel granulocyte *N*-formyl peptide receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1992. **184**: 582–589.
- Fiore, S., Maddox, J. F., Perez, H. D. and Serhan, C. N., Identification of a human cDNA encoding a functional high affinity lipoxin A₄ receptor. *J. Exp. Med.* 1994. **180**: 253–260.
- Le, Y., Murphy, P. M. and Wang, J. M., Formyl-peptide receptors revisited. *Trends Immunol.* 2002. **23**: 541–548.
- Ying, G., Iribarren, P., Zhou, Y., Gong, W., Zhang, N., Yu, Z. X., Le, Y., Cui, Y. and Wang, J. M., Humanin, a newly identified neuroprotective factor, uses the G protein-coupled formylpeptide receptor-like-1 as a functional receptor. *J. Immunol.* 2004. **172**: 7078–7085.
- Durstin, M., Gao, J.-L., Tiffany, H. L., McDermott, D. and Murphy, P. M., Differential expression of members of the *N*-formylpeptide receptor gene cluster in human phagocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1994. **201**: 174–179.
- Christophe, T., Karlsson, A., Dugave, C., Rabiet, M. J., Boulay, F. and Dahlgren, C., The synthetic peptide Trp-Lys-Tyr-Met-Val-Met-NH₂ specifically activates neutrophils through FPRL1/LXA₄R and is an agonist for the orphan monocyte-expressed chemoattractant receptor FPRL2. *J. Biol. Chem.* 2001. **276**: 21585–21593.
- Betten, A., Bylund, J., Cristophe, T., Boulay, F., Romero, A., Hellstrand, K. and Dahlgren, C., A proinflammatory peptide from *Helicobacter pylori* activates monocytes to induce lymphocyte dysfunction and apoptosis. *J. Clin. Invest.* 2001. **108**: 1221–1228.
- Migeotte, I., Riboldi, E., Franssen, J. D., Gregoire, F., Loison, C., Wittamer, V., Detheux, M. et al., Identification and characterization of an endogenous chemotactic ligand specific for FPRL2. *J. Exp. Med.* 2005. **201**: 83–93.
- Gao, J. L., Lee, E. J. and Murphy, P. M., Impaired antibacterial host defense in mice lacking the *N*-formylpeptide receptor. *J. Exp. Med.* 1999. **189**: 657–662.
- Carp, H., Mitochondrial *N*-formylmethionyl protein as chemoattractants for neutrophils. *J. Exp. Med.* 1982. **155**: 264–275.
- Dahlgren, C., Christophe, T., Boulay, F., Madianos, P., Rabiet, M.-J. and Karlson, A., The synthetic chemoattractant Trp-Lys-Tyr-Met-Val-DMet activates neutrophils preferentially through the lipoxin A₄ receptor. *Blood* 2000. **95**: 1810–1818.
- Wenzel-Seifert, K. and Seifert, R., Cyclosporin H is a potent and selective formylpeptide receptor antagonist. *J. Immunol.* 1993. **150**: 4591–4599.
- Yang, D., Chen, Q., Gertz, B., He, R., Phulsuksombati, M., Ye, R. D. and Oppenheim, J. J., Human dendritic cells express functional formyl peptide receptor-like-2 (FPRL2) throughout maturation. *J. Leukoc. Biol.* 2002. **72**: 598–607.
- Babior, B. M., NADPH oxidase: An update. *Blood* 1999. **93**: 1464–1476.
- Shawar, S. M., Rich, R. R. and Becker, E. L., Peptides from the amino-terminus of mouse mitochondrially encoded NADH dehydrogenase subunit 1 are potent chemoattractants. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1995. **211**: 812–818.
- Chiang, N., Fierro, I. M., Gronert, K. and Serhan, C. N., Activation of lipoxin A₄ receptors by aspirin-triggered lipoxins and selected peptides evokes ligand-specific responses in inflammation. *J. Exp. Med.* 2000. **191**: 1197–1207.
- Cui, Y., Le, Y., Yazawa, H., Gong, W. and Wang, J. M., Potential role of the formyl peptide receptor-like 1 (FPRL1) in inflammatory aspects of Alzheimer's disease. *J. Leukoc. Biol.* 2002. **72**: 628–635.
- Shawar, S. M., Cook, R. G., Rodgers, J. R. and Rich, R. R., Specialized functions of MHC class I molecules. I. An *N*-formyl peptide receptor is required for construction of the class I antigen Mta. *J. Exp. Med.* 1990. **171**: 897–912.
- Pamer, E. G., Wang, C. R., Flaherty, L., Lindahl, K. F. and Bevan, M. J., H-2 M3 presents a *Listeria monocytogenes* peptide to cytotoxic T lymphocytes. *Cell* 1992. **70**: 215–223.
- Lindahl, K. F., Byers, D. E., Dabhi, V. M., Hovik, R., Jones, E. P., Smith, G. P., Wang, C. R., Xiao, H. and Yoshino, M., H2-M3, a full-service class Ib histocompatibility antigen. *Annu. Rev. Immunol.* 1997. **15**: 851–879.

- 29 Lenz, L. L., Dere, B. and Bevan, M. J., Identification of an H2-M3-restricted *Listeria* epitope: implications for antigen presentation by M3. *Immunity* 1996. 5: 63–72.
- 30 Gulden, P. H., Fischer, P., 3rd, Sherman, N. E., Wang, W., Engelhard, V. H., Shabanowitz, J., Hunt, D. F. and Pamer, E. G., A *Listeria monocytogenes* pentapeptide is presented to cytolytic T lymphocytes by the H2-M3 MHC class Ib molecule. *Immunity* 1996. 5: 73–79.
- 31 Princiotta, M. F., Lenz, L. L., Bevan, M. J. and Staerz, U. D., H2-M3 restricted presentation of a *Listeria*-derived leader peptide. *J. Exp. Med.* 1998. 187: 1711–1719.
- 32 Dabhi, V. M. and Lindahl, K. F., Short peptides sensitize target cells to CTL specific for the MHC class Ib molecule, H2-M3. *Eur. J. Immunol.* 1998. 28: 3773–3782.
- 33 Wang, C. R., Castano, A. R., Peterson, P. A., Slaughter, C., Lindahl, K. F. and Deisenhofer, J., Nonclassical binding of formylated peptide in crystal structure of the MHC class Ib molecule H2-M3. *Cell* 1995. 82: 655–664.
- 34 Chiang, N., Fierro, I. M., Gronert, K. and Serhan, C. N., Activation of lipoxin A₄ receptors by aspirin-triggered lipoxins and selected peptides evokes ligand specific responses in inflammation. *J. Exp. Med.* 2000. 191: 1197–1207.
- 35 Shawar, S. M., Vyas, J. M., Rodgers, J. R., Cook, R. G. and Rich, R. R., Specialized functions of major histocompatibility complex class I molecules. II. Hmt binds *N*-formylated peptides of mitochondrial and prokaryotic origin. *J. Exp. Med.* 1991. 174: 941–944.
- 36 Harada, M., Habata, Y., Hosoya, M., Nishi, K., Fujii, R., Kobayashi, M. and Hinuma, S., *N*-Formylated humanin activates both formyl peptide receptor-like 1 and 2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2004. 324: 255–261.
- 37 Morse, M. C., Bleau, G., Dabhi, V. M., Hetu, F., Drobetsky, E. A., Lindahl, K. F. and Perreault, C., The COI mitochondrial gene encodes a minor histocompatibility antigen presented by H2-M3. *J. Immunol.* 1996. 156: 3301–3307.
- 38 Tardif, M., Rabiet, M.-J., Christophe, T., Milcent, D. and Boulay, F., Isolation and characterization of a variant HL60 cell line defective in the activation of the NADPH oxidase by phorbol myristate acetate. *J. Immunol.* 1998. 161: 6885–6895.

ANNEXE D

Rabiet, M.J., Huet, E. and Boulay, F. (2007)

Biochimie, In Press

**The N-formyl peptide receptors and the
anaphylatoxin C5a receptors : an overview**



The *N*-formyl peptide receptors and the anaphylatoxin C5a receptors: An overview

Marie-Josèphe Rabet, Emilie Huet, François Boulay*

Laboratoire de Biochimie et de Biophysique des Systèmes Intégrés, CEA, CNRS, Université Joseph Fourier, Institut de Recherches en Technologies et Sciences pour le Vivant (iRTSV), Commissariat à l'Energie Atomique Grenoble, 17 rue des martyrs, 38054 Grenoble cedex 9, France

Received 8 December 2006; accepted 23 February 2007

Abstract

Leukocyte recruitment to sites of inflammation and infection is dependent on the presence of a gradient of locally produced chemotactic factors. This review is focused on current knowledge about the activation and regulation of chemoattractant receptors. Emphasis is placed on the members of the *N*-formyl peptide receptor family, namely FPR (*N*-formyl peptide receptor), FPRL1 (FPR like-1) and FPRL2 (FPR like-2), and the complement fragment C5a receptors (C5aR and C5L2). Upon chemoattractant binding, the receptors transduce an activation signal through a G protein-dependent pathway, leading to biochemical responses that contribute to physiological defense against bacterial infection and tissue damage. C5aR, and the members of the FPR family that were previously thought to be restricted to phagocytes proved to have a much broader spectrum of cell expression. In addition to *N*-formylated peptides, numerous unrelated ligands were recently found to interact with FPR and FPRL1. Novel agonists include both pathogen- and host-derived components, and synthetic peptides. Antagonistic molecules have been identified that exhibit limited receptor specificity. How distinct ligands can both induce different biological responses and produce different modes of receptor activation and unique sets of cellular responses are discussed. Cell responses to chemoattractants are tightly regulated at the level of the receptors. This review describes in detail the regulation of receptor signalling and the multi-step process of receptor inactivation. New concepts, such as receptor oligomerization and receptor clustering, are considered. Although FPR, FPRL1 and C5aR trigger similar biological functions and undergo a rapid chemoattractant-mediated phosphorylation, they appear to be differentially regulated and experience different intracellular fates.

© 2007 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

Keywords: Chemoattractant receptors; Anaphylatoxin; *N*-formyl peptide; Signal transduction; Phosphorylation; Internalization

1. Introduction

Polymorphonuclear phagocytes accumulate in infected and/or inflamed tissue, and are of critical importance in the initial defense against microorganisms and the pathogenesis of inflammatory diseases. Upon activation by soluble or particulate products of either exogenous or endogenous origin, they penetrate the endothelial barrier and migrate to the inflammatory sites (chemotaxis). Once neutrophils have reached the site of inflammation, they phagocytose foreign particles and invading

microorganisms. Phagocytosis is accompanied by the release of reactive oxygen species (ROS) and proteolytic enzymes that play a critical role in the clearance of invading pathogens. These components are also responsible for tissue damage associated with a number of inflammatory disorders. The migration of leukocytes from the blood stream towards sites of infection and inflammation is dependent on the gradient of chemotactic factors derived from pathogens or host tissues. In the mid-1970s, it was demonstrated that small *N*-formylated peptides deriving from the catabolism of either bacterial products [1,2] or components from disrupted mitochondria [3] were potent activators of neutrophils. Since then, a growing number of chemoattractants have been discovered. These include the complement component C5a, lipid metabolites

* Corresponding author. Tel.: +33 438 78 31 38; fax: +33 438 78 51 85.

E-mail address: francois.boulay@cea.fr (F. Boulay).

such as leukotriene B4 and platelet-activating factor (PAF), a large group of chemokines, and a variety of virus- and host-derived proteins and peptides. These chemoattractants engage receptors that belong to the seven transmembrane G protein-coupled receptor (GPCR) family and trigger identical neutrophil responses, i.e. chemotaxis, up-regulation of surface receptors, release of proteolytic enzymes from granules, and ROS production [4]. These responses are largely inhibited by *Bordetella pertussis* toxin, indicating that signal transduction is dependent on a heterotrimeric G protein of the Gi type.

In this review, we will present current knowledge about the peptide-induced activation of chemoattractant receptors and their regulation, with special emphasis on the human formyl peptide receptor family (FPR, FPRL1, and FPRL2) and the human receptors for the complement component C5a (C5aR and C5L2).

2. The FPR family

2.1. FPR and its homologues FPRL1 and FPRL2

The prototypical *N*-formylated peptide, *N*-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine (fMLF) binds with high affinity to human FPR, which was the first neutrophil chemoattractant receptor to be characterized biochemically [5]. Its primary structure remained elusive until two allelic forms (FPR26 and FPR98) were cloned from a differentiated HL-60 cell library by an expression cloning strategy [6,7]. This breakthrough opened the way for the discovery of a rapidly expanding family of myeloid cell chemoattractant receptors (reviewed in Ref. [4]). Two structurally related receptors, FPRL1 and FPRL2, were further cloned by low-stringency hybridization with the human FPR cDNA as a probe [8–10]. All three receptor genes were shown to form a cluster on chromosome 19. Despite a high degree of amino acid identity with FPR (69%), FPRL1 binds fMLF only with low affinity. It is also referred to as LXAR, because the lipid mediator lipoxin A₄ (LXA₄), an eicosanoid with anti-inflammatory properties, was the first endogenous ligand shown to bind with high affinity to FPRL1 [11]. The biological effects of LXA₄, and current knowledge of the mechanisms underlying its anti-inflammatory properties, are discussed in recent reviews [12,13]. The third member of the human FPR family, FPRL2, shares 56% amino acid identity with human FPR, but it does not bind or respond to fMLF. These two homologues exhibit a high degree of amino acid identity with FPR in the cytoplasmic loops, whereas the carboxyl tails are more divergent.

Although human FPR and FPRL1 originate from a common ancestor and are structurally and functionally related, they appear to have followed different evolutionary pathways. An extensive investigation of the frequency of polymorphism in the open reading frame of human *FPR* and *FPRL1* identified for *FPR* seven common sites of polymorphisms in Caucasians, Blacks, and Asians, whereas no polymorphisms could be detected for *FPRL1* in the same three racial groups [14]. The reason for the high frequency of single nucleotide polymorphisms (SNP) in the coding sequence of *FPR* is presently unknown. It may enable phagocytes to escape untimely activation by

N-formyl peptides secreted by pathogens or be an adaptation that allows FPR to bind to a much wider variety of agonists. Apart from the fact that two SNPs (R190W and N192K) in the second extracellular loop of FPR appear to be associated with aggressive periodontitis [15], little is known about the consequences of SNP in FPR as regard the expression of the receptor, its function, or its affinity for the ligand. The functional analysis performed on the FPR isoforms originally isolated, namely FPR26 (V101, N192, and E346), FPR98 (L101 and A346), and FPR-G6 (V101, K192, and E346), indicates that some SNPs, like those found in FPR98 and FPR-G6 may result in a partial defect in the coupling of Gi protein to FPR26. In transfected cells, FPR26 has a high degree of constitutive activity that seems to be due to the presence of E346 [16]. These results therefore indicate that some SNPs may dramatically affect the functionality of the receptor.

2.2. Novel ligands that activate or inhibit the members of the FPR family

During the past few years, many new agonists and/or antagonistic compounds were discovered that bind to FPR, FPRL1 or FPRL2. Both FPR and FPRL1 have emerged as promiscuous receptors that can be activated by a wide range of structurally unrelated peptide agonists that are classified either as synthetic or host- and pathogen-derived agonists. FPRL2 is activated with low potency by several non-formylated chemotactic peptides that are also agonists for FPRL1 [17,18]. Recently, an acetylated amino-terminal peptide derived from the human heme-binding protein has been identified as a natural ligand specific for FPRL2 [19,20].

2.2.1. Antagonists

Antagonistic components have been identified for both FPR and FPRL1. *In vitro*, the action of fMLF can be antagonized by various peptide analogs. For many years, the *N*-tert-butoxycarbonyl-Phe-Leu-Phe-Leu-Phe-OH peptide (*t*-BOC peptide) was known as the most potent competitive antagonist [21]. Peptides with antagonistic properties were engineered by substituting the amino terminus of the tripeptide Met-Leu-Phe with branched carbamates, such as *iso*- and *tert*-butyloxycarbonyl, whereas unbranched carbamates, such as methoxycarbonyl and ethoxycarbonyl, resulted in agonist activity [22]. However, none of these antagonists is totally selective for the FPR. In 1993, the cyclic undecapeptide cyclosporine H (CsH), which is derived from the fungus *Tolypocladium inflatum*, was described as a strong inhibitor of FPR, being around 10 times more potent and more selective than previously described antagonists [23]. CsH acts as an inverse agonist, switching the receptor from the active state (R*) to the inactive state (R) [24].

Peptides or proteins with antagonist properties were found to be secreted by pathogens. Peptides derived from the membrane proximal region of fusion proteins of human immunodeficiency virus 1 and 2, Ebola virus, coronavirus 229E, and severe acute respiratory syndrome (SARS) coronavirus act as potent antagonists of FPR [25]. A 121-residue chemotaxis inhibitory protein secreted by *Staphylococcus aureus*, known

as CHIPS, binds to FPR and thereby specifically blocks phagocyte responses and suppresses the first line of defense against this pathogen [26]. A 105-residue FPRL1 inhibitory protein, referred to as FLIPr, that presents 28% homology with CHIPS was also isolated from *S. aureus* [27]. Thus, by blocking these two chemoattractant receptors, *S. aureus* appears to have engineered mechanisms to escape the first line of defense constituted by phagocytes.

Recently, ligand-based virtual screening was combined with high-throughput flow cytometry to identify novel non-peptidic antagonists to FPR [28]. Such compounds may prove to have pharmacological use. In a search for FPRL1 antagonists in hexapeptide libraries, a novel peptide, Trp-Arg-Trp-Trp-Trp-CONH₂ (WRWWWW), was identified that showed the most potent activity in terms of inhibiting agonist binding to FPRL1 [29]. The hexapeptide WRWWWW is presently one of the rare compounds that specifically blocks the activation of FPRL1. Recently, PBP10, a cell-permeable rhodamine B-coupled polyphosphoinositide-binding peptide (QRLFQVKGR), derived from gelsolin (region 160–169) [30], was found to block FPRL1-mediated signalling [31]. This blockage appears to be specific, since it has no inhibitory effect on the neutrophil response mediated through FPR, C5aR, or CXCR1/2 [31].

2.2.2. Synthetic agonists

By screening a random peptide library, Ryu et al. identified two amidated synthetic hexapeptides, Trp-Lys-Tyr-Met-Val-Met-NH₂ (WKYMVM) and Trp-Lys-Tyr-Met-Val-D-Met-NH₂ (WKYVMm), that differed in their ability to activate the three FPR receptors [32,33]. While the D-methionine-containing peptide activated all three receptors with a markedly higher efficacy for FPRL1, the peptide containing the L-isomer had lost most of its ability to activate FPR [18,34,35]. Another small, unrelated, peptide, called MMK-1 (LESIFRSLLFRVM), which was also derived from a random peptide library, was found to specifically activate FPRL1 [36].

2.2.3. Pathogen-derived agonists

The pathogen-derived agonists include peptide domains from virus and bacteria. Several cryptic peptides of HIV-1 envelope proteins have been shown to activate myeloid cells via FPR and/or FPRL1. For example, T20/DP178, a peptide fragment located in the C-terminal part of HIV-1_{LAV} envelope protein gp41 (aa 643–678) is a functional ligand for FPR, whereas two partially overlapping peptides, T21/DP107 (aa 558–595) and N36 (aa 546–581), in a leucine zipper-like domain of gp41 of HIV-1_{LAV}, activate FPRL1 [37,38]. Two peptides, named F and V3, derived from the HIV-1_{LAV} envelope protein gp120, are also good activators of FPRL1 [39,40]. Like the prototypical N-formylated peptide fMLF, the synthetic peptides fMIVIL and fMIVTFL, that represent putative degradation fragments from *Listeria monocytogenes* components were found to be 100-fold more active on FPR than on FPRL1, and completely inactive on FPRL2 [41]. Hp(2–20), an antibacterial, cecropin-like peptide derived from the N-terminal sequence of *Helicobacter pylori* ribosomal protein L1, activates both calcium mobilization and the NADPH

oxidase in neutrophils via FPRL1 and to a lower extent in monocytes via FPRL2 [17,42]. Using overlapping synthetic peptides to scan the secreted glycoprotein G from Herpes virus type 2 (HSV-2), Bellner et al. [43] have identified a 15 amino acid long peptide (gG-2p20, aa 190–205) that serves as a chemoattractant for both neutrophils and monocytes through the FPR. The ROS secreted in response to binding of Hp(2–20) to FPRL1 and FPRL2 or gG-2p20 to FPR were shown to specifically inhibit NK cell cytotoxicity and to induce the apoptosis of these cells. This immune escape might be of importance for the pathogenesis of *H. pylori* and HSV-2.

2.2.4. Host-derived agonists

Since the identification of the lipid mediator lipoxin A₄ as a high-affinity agonist for FPRL1 [11], numerous host-derived agonists have been identified. Amyloidogenic proteins, or fragments of such proteins, have been found to activate myeloid cells through FPRL1. Serum amyloid A (SAA), a protein secreted during the acute phase of inflammation and involved in chronic inflammation-associated systemic amyloidosis, was the first amyloidogenic ligand found to be specific for FPRL1 [44]. Further, it has been shown that FPRL1 also serves as a receptor mediating the proinflammatory responses elicited by the fragment 1–42 of amyloid β (A β ₄₂), a protein that plays an important role in neurodegeneration in Alzheimer disease [45]. The reader is referred to a recent review that discusses the role of FPRL1 in microglial cell responses in Alzheimer disease [46]. Finally, the neurotoxic prion peptide fragment PrP_{106–126}, which is also an amyloidogenic polypeptide, was found to activate FPRL1 [47]. In addition to these protein fragments, the neuroprotective peptide, humanin, a 24-aa peptide detected in the occipital region of the brain, uses FPRL1 as a functional receptor [48]. Although humanin and A β ₄₂ are both able to activate FPRL1, only A β ₄₂ causes apoptotic death of the cells. From these observations, Ying and coworkers [48] have suggested that humanin may exert its neuroprotective effect by competitively inhibiting the access of FPRL1 to A β ₄₂. This is the only one possible mechanism, since humanin has also been shown to bind to the apoptosis-inducing protein Bax in the cytoplasm and, thereby suppress apoptosis by preventing Bax translocation from the cytoplasm to the mitochondria [49].

Additional host-derived peptides and proteins that act as FPR/FPRL1 agonists were reported over the past few years. LL-37, a 37-residue fragment of a human antimicrobial protein of the cathelicidin family, was found to have chemotactic properties on neutrophils, monocytes, and T cells, via the activation of FPRL1 [50]. However, the fact that micromolar concentrations of LL-37 are required to mediate chemotaxis in leukocytes and calcium mobilization in FPRL1-transfected 293 cells and monocytes is indicative of a low affinity of LL-37 for FPRL1. The proinflammatory and antimicrobial neutrophil granule protein cathepsin G is also a chemotactic agonist for the FPR, but unlike fMLF it does not trigger calcium mobilization in phagocytes, although it is able to rapidly induce mitogen-activated protein (MAP) kinase phosphorylation [51]. This also suggests that cathepsin G is a low-affinity agonist and that a threshold of occupied receptor has to be

reached for calcium mobilization to occur. Thus, antimicrobial proteins released from neutrophil granules or peptides deriving from such proteins may establish a link between innate and adaptative immunity through their ability to recruit dendritic cells via the activation of the *N*-formyl peptide receptors. Formylated hexapeptides derived from the N-terminal region of subunits 4 (fMLKLIV) and 6 (fMMYALF) of human mitochondrial NADH dehydrogenase are potent activators of calcium mobilization through both FPR and FPRL1 [41]. These peptides may play a crucial role in the clearance of necrotic cells. Annexin I, a protein that is localized in the cytosol of resting neutrophils, is known to inhibit neutrophil extravasation in models of acute and chronic inflammation and is believed to act on the neutrophil in an autocrine/paracrine manner to reduce cell extravasation. Annexin I and its bioactive N-terminal peptides (Ac2–26 and Ac9–25) activate different signalling pathways in neutrophils in a dose-dependent manner through the FPR family members [52]. While annexin I binds to FPRL1 only, Ac2–26 binds to both FPR and FPRL1 [53]. In contrast, the annexin I peptide Ac9–25 activates phagocyte ROS production exclusively through FPR [54]. Finally, a recent study demonstrates that the pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide 27 (PACAP27), a multifunctional neuropeptide hormone that influences the immune system by both suppressing and activating inflammation through the regulation of several interleukins, activates neutrophils via FPRL1 stimulation [55].

It is likely that this family of receptors plays a critical role in the regulation of the inflammatory processes associated with host defense, tissue damage, and neurodegenerative diseases. The role of the FPR in host defense against bacterial infections is supported by the observation that the invalidation of FPR in mice confers to the animals a higher susceptibility to infection when they are challenged with *L. monocytogenes* [56]. The observation that the orthologue of FPRL1 in mice is unable to compensate for the loss of FPR is consistent with the much lower affinity of the *Listeria*-derived peptides for FPRL1 [41]. The engagement of the FPR family by pathogen-derived agonists may have different consequences depending on the amount of chemoattractant that is released. At low concentrations of agonist, the engagement of the FPRs could contribute to the infiltration of phagocytes to the local site of infection, where they degrade the invading pathogens. The process might be amplified by the release of host-derived molecules that would attract more phagocytic cells, thereby leading to an enhanced inflammation and tissue damage. At high concentration of agonist, phagocytic cells are fully activated and release reactive oxygen species (ROS) that may locally create an immunosuppression. In addition, the activated FPR and FPRL1 become down-regulated and/or desensitized through phosphorylation and internalization (see Section 6). Both FPR and FPRL1 have also been shown to down-regulate other chemotactic receptors that participate in host defense. These different mechanisms might allow pathogens to escape and propagate, as seems to be the case for *H. pylori* and Herpes simplex virus-2.

3. The complement C5a receptor (CD88) and C5L2

3.1. The C5a receptor (C5aR)

The complement system is part of the humoral innate immune system. Its activation in a cascade via three convergent pathways leads to the generation of small fragments (10 kDa) of C3, C4, and C5 components that are referred to as anaphylatoxins C3a, C4a, and C5a, respectively. All three anaphylatoxins contain a carboxyl-terminal arginine residue that is rapidly cleaved by serum carboxypeptidase to yield the desarginine (desArg) derivatives. The desArg forms exhibit a dramatic decrease in biological activity. The C5a anaphylatoxin is a potent proinflammatory mediator which exerts its effect by binding to the C5aR. Elucidation of the amino acid sequence of the C5aR was independently achieved by two groups using totally different strategies [57,58]. The overall protein presents 34% amino acid sequence identity with that of FPR. The reader is referred to several reviews that described in details the structure and function relationships of the C5aR [4,59]. Interestingly, the C5aR is encoded by a single copy gene that is located on chromosome 19 close to the genes for FPR, FPRL1, and FPRL2. In contrast to FPR, only two single nucleotide polymorphisms have been identified for C5aR. One silent nucleotide change (C450T) is located in the coding sequence [60]. The second site is located in the promoter region at position –245 (T/C) and is apparently not associated with a particular disorder [61]. The very low frequency of single nucleotide polymorphism in C5aR suggests a selective pressure for the maintenance of a conserved receptor structure. Indeed, in contrast to the FPR, many engineered single point mutations in C5aR generally affect ligand binding, G protein activation, or surface expression [62].

The function of C5aR in host defense was clearly demonstrated by gene deletion in mice. In a model of *Pseudomonas aeruginosa*-mediated lung infection, mice deficient in C5aR have a higher rate of mortality [63]. Furthermore, in the model of *Escherichia coli*-induced inflammatory response, the activation of C5aR is required for the *E. coli*-induced up-regulation of CR3 and the subsequent superoxide production and phagocytosis [64]. The inappropriate activation of the complement system leads to inflammatory disorders and a number of pathologies. For instance, during sepsis, an excessive generation of the C5a anaphylatoxin and activation of C5aR has detrimental effects [65,66]. In experimental sepsis, the blockade of C5a by infusion of antibody against C5a has been shown to improve hemodynamic parameters [67]. In the cecal ligation/puncture rodent model for sepsis, preventing the interaction of C5a with its receptor greatly improves the survival of the animals [65]. Further work points out the role played by the couple C5a/C5aR in the dysfunction of cardiomyocyte contractility during sepsis [68]. In this context, the reader is referred to a recent review in which current knowledge regarding the pathophysiology underlying cardiac dysfunction during sepsis is discussed [69]. Thus, the blockade of C5a or its receptor may be a promising strategy for the treatment of sepsis in humans.

3.2. The anaphylatoxin C5a-binding protein, C5L2

The gene encoding the orphan receptor C5L2 localizes to the same region of chromosome 19 as C5aR and the different members of the FPR family. C5L2 was shown to be co-expressed with C5aR on leukocytes and immature (but not mature) dendritic cells [70] as well as in astrocytes where it is up-regulated by noradrenaline [71]. This receptor, which presents 36% amino acid identity with the C5aR (Fig. 1), was found to be a high-affinity receptor for C5a and C5a_{desArg} [72,73]. However, unlike C5aR, C5L2 exhibits an apparent absence of coupling with the heterotrimeric G_i protein, and it is not internalized [72,73]. A recent study using mice deficient in C5L2 shows that bone marrow cells derived from C5L2^{-/-} mice are more responsive to C5a as compared to cells derived from wild type animals in *in vitro* chemotaxis assays [74]. Furthermore, immune complex pulmonary injury in C5L2^{-/-} mice results in both a greater influx of inflammatory cells and a greater release of IL-6 and TNF- α as compared to wild type animals. This study suggests that C5L2 acts independently of the C5aR to counteract the C5a/C5aR-mediated inflammation. It is, nevertheless, unclear as to how C5L2 mediates its anti-inflammatory activity. Several hypotheses that are not mutually exclusive have been proposed. C5L2 may act as a decoy receptor that modulates the biological activity of C5a during the inflammatory process or it may form oligomers with the C5aR. Alternatively, C5L2 may trigger the activation of a non-conventional anti-inflammatory signalling pathway.

3.3. C5aR antagonists

The C-terminal domain of C5a contains the determinants responsible for C5aR activation and it has been used to design small peptide antagonists. A short peptide, methyl-Phe-Lys-Pro-D-Cyclohexylamine-Trp-D-Arg (MeFKPdChaWr) has been demonstrated to antagonize C5a-mediated polymorphonuclear activation, albeit with a low potency [75]. A step towards the finding of a potent and selective antagonist was achieved with the design of a restrained structure, acetyl-Phe[Orn-Pro-D-Cyclohexylamine-Trp-Arg] (AcF[OPdChaWR]), which was found to be 30 times more potent than MeFKPdChaWr for blocking the C5aR [76]. The 121-residue chemotaxis inhibitory protein, an excreted virulence factor of *S. aureus* (CHIPS), represents a new class of antagonists that suppresses the fMLF- and C5a-mediated activation of neutrophils and monocytes by binding and blocking specifically the FPR and the C5aR [77].

4. Cell type distribution of the members of FPR and C5aR families

As more specific ligands were discovered and the immunological tools refined, FPR family members and C5aR were found to be expressed differently by a variety of cell types and not restricted to phagocytes as previously thought (Table 1). FPRL2 is present in monocytes/macrophages but not in neutrophils, whereas FPR, FPRL1, and C5aR are expressed in neutrophils and monocytes/macrophages. Human dendritic cells express FPRL2 and C5aR throughout maturation, whereas FPR is only present in immature dendritic cells [78,79]. No functional FPRL1 could be detected in either immature or mature dendritic cells [80]. The expression of the formyl peptide receptors in a variety of cells other than phagocytic cells suggests that they might have functional roles beyond that of host defense in innate immune response. C5aR expression was originally described in myeloid cells, including neutrophils, monocytes, eosinophils, basophils, immature and mature dendritic cells. The C5aR has also been found in glial cells [81,82], cerebellar granule cells [83], vascular endothelial cells [84–86] and in cells of liver and lung [87,88]. Its expression is up-regulated in regenerating hepatocytes [89] and, during the early phase of sepsis, in heart tissue [90]. C5L2 transcripts were observed in many organs and tissues including heart, lung, spleen, liver, placenta, skeletal muscle, bone marrow [73], and several regions of the brain [91].

5. Chemoattractant-mediated intracellular signalling

5.1. Signal transduction

Chemoattractant receptors, including C5aR and the members of the FPR family, are coupled to the heterotrimeric G proteins of the G_i subtype as evidenced by the observation that chemoattractant-mediated neutrophil functions, i.e. chemotaxis, degranulation, and superoxide production, are largely inhibited by treatment of cells with pertussis toxin (PTX) [92].

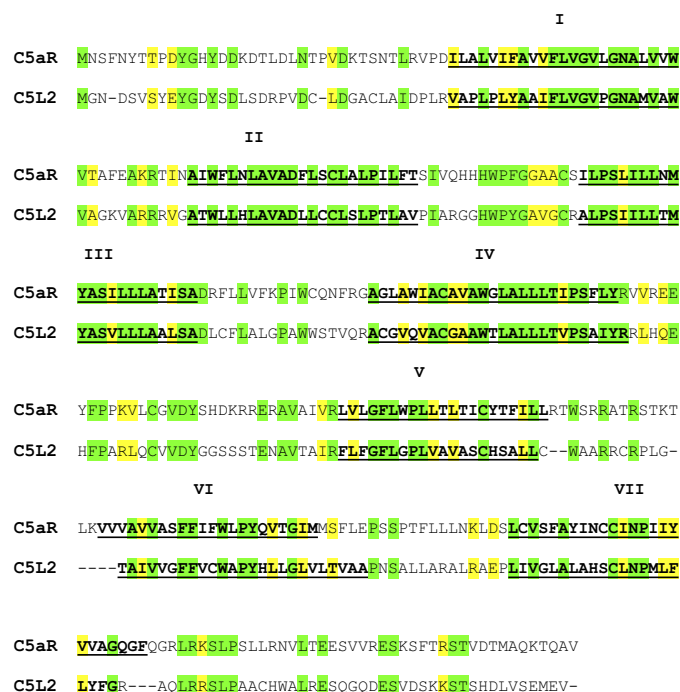


Fig. 1. Alignment of the amino acid sequence of the C5a receptor and C5L2, a non-signalling C5a receptor. Residues that are identical are highlighted in green, whereas homologous amino acids are highlighted in yellow. The transmembrane α -helices are underlined.

Table 1
Cell type and tissue expression of FPR, FPRL1, FPRL2, C5aR, and C5L2

Receptors	Cells and tissues	Methods of detection
FPR	Neutrophils; monocytes/macrophages; differentiated U937, HL-60 and NB4 Immature dendritic cells; astrocytes (HSC2), microglia, neuroblastoma [82]; glioblastoma [198]; hepatocytes [199]; Kupffer cells; endothelial cells; lung carcinoma cells; epithelial enzyme-secreting cells, smooth muscle cells of muscularis propria and of mucosa of ileum, arterioles, retina, some neurons [200,201]	Ligand binding Flow cytometry, immunofluorescence, RT-PCR, and immunohistochemistry
FPRL1	Neutrophils; monocytes/macrophages; differentiated HL-60 cells Colonic epithelial cells (T84, HT29, Caco-2, CL. 19A) [202]; medial tissue of coronary arteries [203]; astrocytoma cell lines [204]	Ligand binding and calcium mobilization Immunohistochemistry ligand binding RT- PCR
FPRL2	Monocytes; immature and mature dendritic cells; lung; medial tissue of coronary arteries [203]	Immunohistochemistry, Northern blot
C5aR	Neutrophils; monocytes/macrophages Immature and mature dendritic cells Bronchial epithelial cells [205], vascular endothelial cells [84–86]; brain endothelial cells in inflamed tissue [206]; cardiomyocytes [68] Astrocytes and glial cells [81,82]; cerebellar granule neurons [83]	Ligand binding Chemotaxis, RT-PCR, Flow cytometry Flow cytometry and RT-PCR, immunohistochemistry Flow cytometry, RT-PCR, immunocytochemistry
C5L2	Granulocytes; immature dendritic cells [70], astrocytes [71], heart, lung, spleen liver, placenta, skeletal muscle, bone marrow	Northern blot, flow cytometry

A schematic view of the main signalling pathways stimulated downstream of the G protein is presented in Fig. 2.

Upon chemoattractant binding, receptors undergo a conformational change that enables them to interact with the G_{i2} protein, thereby triggering both the exchange of GDP to GTP in the G protein α subunit and the dissociation of the $\beta\gamma$ complex from the α subunit [93]. In neutrophils, monocytes and differentiated HL-60 cells, a small PTX-resistant fMLF- or C5a-mediated activity is often observed that may result from the coupling of FPR and C5aR to residual molecules of G_{i6} , a promiscuous G protein of the G_q class, restricted to a subset of myeloid cells in the early steps of differentiation. In co-expression systems, FPR and C5aR can also couple to G_{i1} , G_0 and a PTX-resistant G protein G_z [94]. Many studies aimed at defining the contact sites

responsible for coupling of G proteins to chemoattractant receptors have led to the notion that G_{i2} protein–receptor interactions most likely involves multiple contact sites with intracellular loop 1, the boundaries of intracellular loops 2 and 3 and restricted regions in the carboxyl tail, as well as in the transmembrane regions [95–99]. A recent study by Matsumoto and coworkers [100,101] provides a comprehensive functional map of the intracellular surface of C5aR. They identified the residues essential for G protein activation in the amino terminal half of intracellular loop 2 and the carboxy-terminal half of intracellular loop 3 as well as the adjoining transmembrane α -helices. The main determinants for G protein specificity are clustered in the carboxy-terminal tail and carboxy-terminal half of intracellular loop 2.

Following its dissociation from the α subunit, the G protein $\beta\gamma$ subunits activate the phospholipase $C\beta_2$ ($PLC\beta_2$) [102] and the phosphoinositide 3-kinase γ ($PI3K\gamma$) [103]. $PI3K\gamma$ converts the membrane phosphoinositol-4,5-bisphosphate (PIP_2) into phosphoinositol-3,4,5-trisphosphate (PIP_3). Deletion of $PI3K\gamma$ in mice has revealed that this enzyme is required for both the directed migration of neutrophils in a gradient of fMLF [104,105] and the generation of superoxide mediated by the stimulation of chemoattractant receptors [106]. $PLC\beta_2$ hydrolyzes plasma membrane PIP_2 into diacylglycerol (DAG) and inositol trisphosphate (IP_3). The latter causes the release of calcium from the intracellular calcium stores. The interplay of calcium and DAG leads to the activation of protein kinase C (PKC) isoforms. Neutrophils and neutrophil-like differentiated HL-60 cells [107,108] express the classical PKC isoforms α , βI , and βII , the novel PKC isoforms δ , and the atypical PKC isoforms ζ . Studies concerning the role of PKC isoforms in neutrophil functions are somewhat contradictory and assignment of PKC isoforms in specific biological functions of neutrophil are relatively scarce. *In vitro* studies or reconstituted superoxide generation systems indicate that several PKC isoforms are involved in the activation and

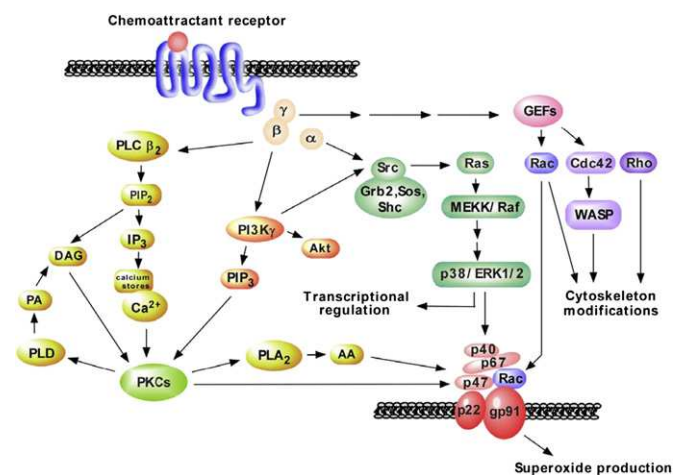


Fig. 2. Schematic summary of the main signalling pathways initiated by C5aR and *N*-formyl peptide receptors in myeloid cells. Agonist binding to the receptors results in dissociation of heterotrimeric G protein into $G\alpha$ -GTP and $G\beta\gamma$ subunits which activate downstream effectors and signalling cascades (see text for details) involved in the regulation of cellular functions (chemotaxis, superoxide production and release of inflammatory mediators). AA, arachidonic acid; PA, phosphatidic acid. Other abbreviations are mentioned in the text.

regulation of the NADPH oxidase. *In vitro*, the cytosolic factor p47^{phox}, a key component in the assembly of the superoxide generating complex, is a substrate for PKC α , β II, δ and ζ [109]. However, in myeloid cells, the identity of the PKC isoforms involved in the phosphorylation of p47^{phox} and the triggering of superoxide production is controversial. Based on the inhibitory effect of antisense RNA to the beta isotype, it has been proposed that PKC β regulates superoxide generation in neutrophils and neutrophil-like differentiated HL-60 cells. It is likely that isotypes other than PKC β are also involved, as indicated by the fact that neutrophils from PKC β knockout mice exhibit only a 50% decrease in the level of superoxide production as compared to neutrophils from normal mice [110]. PKC α has been implicated in the generation of superoxide in monocytes [111]. The reconstitution of FPR-induced NADPH oxidase activation in transgenic COS-phox cells has indicated that PKC δ , but not PKC α , β II, and ζ , is involved in the generation of superoxide [112].

Activation of several other kinases is also intimately involved in chemoattractant signalling. The extracellular signal-regulated kinases (ERK1/2) and the stress-activated p38 MAP kinase are activated by chemoattractants in neutrophils. These two signalling pathways are thought to participate at different degrees in adherence, chemotaxis and superoxide production. The pathway leading to p38 activation has not been completely deciphered, whereas that for ERK1/2 activation has been reconstituted [113]. The G protein $\beta\gamma$ subunits recruit PI3K γ to the plasma membrane, thereby enhancing the activity of Src-like tyrosine kinases, which phosphorylate docking proteins such as the Shc adaptor protein. A functional association between Shc, Grb2 and SOS follows, leading to the activation of the Ras-Raf-MEK-ERK pathway.

Intracellular effectors coupled to the FPR or C5aR signalling cascade include, among others, phospholipase A₂- α (PLA₂- α), phospholipase D (PLD), mitogen-activated protein kinases (MAPK), and c-Src family kinases [114–116]. PLA₂- α is phosphorylated by MAP kinases and is translocated to the plasma membrane in a calcium-dependent manner [117]. The requirement of PLA₂- α for the activation of the NADPH oxidase had been proposed on the basis of the inhibition of superoxide release after targeting of PLA₂ with antisense RNA in differentiated HL-60 cells. The resulting defect can be compensated for by the addition of arachidonic acid [118]. However, these results are contradicted by a recent study showing that PLA₂ gene disruption in mice did not affect superoxide generation, even though the release of arachidonic acid was totally suppressed [119].

The stimulation of C5aR or N-formyl peptide receptors leads to the activation of low molecular weight G proteins of the Rho family (Rho, Rac and Cdc42), via the activation of guanine-nucleotide exchange factors (GEFs) such as Vav1 or pRex1 [120,121]. The Rho GTPases are key regulators of many leukocyte functions, including adhesion to endothelial cells, chemotaxis and superoxide generation (for a review see Ref. [122]). RhoA is thought to be involved in chemoattractant-mediated triggering of adhesion through integrins. The Rho GTPase Rac2 plays a pivotal role in the formation

of an active NADPH oxidase complex (for a review see Ref. [123]), whereas Rac1 and Cdc42 are involved in the remodelling of the actin cytoskeleton at the leading edge of migrating neutrophils. The activation of Cdc42 is thought to release the auto-inhibited conformation of the Wiskott–Aldrich syndrome protein (WASP), a multidomain protein that is an activator of the nucleating Arp2/3 complex [124,125]. It has been shown that the C-terminal cytoplasmic tail of the C5aR interacts with WASP when the auto-inhibited conformation is released [126]. This interaction could provide the C5aR with a mean of controlling the precise area at the cell surface where actin has to polymerise during the directed migration of leukocytes along a gradient of C5a.

5.2. FPR and FPRL1 induce intracellular calcium mobilization through different pathways

Although many functions of the neutrophil, including chemotaxis, exocytosis, and superoxide generation, can take place in calcium-depleted cells, it is clear that a transient rise in intracellular calcium is required, albeit not sufficient, for triggering optimal chemoattractant-mediated responses [127]. Despite the fact that FPR and FPRL1 share a high degree of amino acid identity and trigger the same neutrophil functions with a similar efficacy through the activation of a PTX-sensitive G_i protein, there is a fundamental difference between the two receptors as to their ability to transduce intracellular signalling. For instance, the mechanisms by which they raise intracellular calcium appear to be different. Recent studies indicate that chemotaxis and calcium responses to the engagement of FPR and FPRL1 are differentially regulated by cyclic adenosine 5'-diphosphate ribosyl cyclase (CD38) [128,129]. The cyclic adenosine 5'-diphosphate ribose (cADPR) has been described as a regulator of calcium signalling [130,131]. The engagement of a subset of chemoattractant receptors, including C5aR, FPR, and the IL-8 receptors (CXCR1/2) results in a cADPR-independent intracellular calcium rise mainly via the release of calcium from the IP₃ receptor-gated stores in the endoplasmic reticulum and secondarily through a modest influx of extracellular calcium. Conversely, FPRL1, CXCR4, CCR1, and CCR5 mobilize calcium in a cADPR-dependent manner and do so primarily through a strong influx of extracellular calcium with a minimal release of calcium from the intracellular stores. Chelating the extracellular calcium abolishes the calcium response mediated by this subset of receptors. Thus, despite the fact that both FPR and FPRL1 couple to the G_i type of heterotrimeric G protein, they activate neutrophil responses through partially overlapping intracellular pathways. It has to be noted here that a unique type of hierarchy inside the FPR family has been recently unveiled [132]. Although FPR and FPRL1 have no ability to cross-desensitize each other, desensitization experiments based on the release of superoxide have indicated that an agonist such as WKYMVm, which has the ability to activate neutrophil responses via both FPR and FPRL1, utilizes the FPR-mediated signalling pathways only when FPRL1 is blocked [132]. One possible mechanism that could explain this hierarchy is that

the agonist-occupied FPRL1 exhibits a higher affinity for the G protein than activated FPR. Consequently, FPR would take over only when FPRL1 is blocked. The difference between FPR and FPRL1 is also particularly well illustrated by the fact that the cell-permeable gelsolin-derived phosphoinositide-binding peptide PBP10 does not block FPR-mediated cellular signalling, whereas it inhibits certain pathways activated by FPRL1, namely granule secretion and the release of superoxide [31]. However, PBP10 has no effect on the mobilization of calcium mediated by FPRL1 [31]. Thus, the PBP10-mediated inhibition is unlikely to take place at the receptor level. The mechanism underlying this selective inhibition is unknown but might possibly result from differences in the localization of the two receptors in membrane micro-domains, in their oligomeric state or in the different interactions of their intracellular regions with the cytoskeleton.

5.3. Differential signalling mediated by peptide ligands

Several reports have demonstrated that distinct peptide agonists can activate different functions via the use of FPRL1 [133–135]. For instance, the activation of FPRL1 by the high-affinity hexapeptide HRYLPM was found to stimulate chemotaxis and superoxide production, whereas the low-affinity peptide HEYLPM and the amyloidogenic protein SAA were good inducers of chemotaxis but poor agonists for the triggering of superoxide release [133]. Similarly, a differential response was observed when FPRL1 was stimulated with WKYMVM or SAA, despite the fact that both ligands led to the phospholipase A₂-mediated release of arachidonic acid, a precursor of leukotriene B₄ (LTB₄) and prostaglandin E₂ (PGE₂) biosynthesis [134]. The engagement of FPRL1 with WKYMVM results in a strong increase in LTB₄ production without affecting PGE₂ production. When FPRL1 is stimulated with SAA, the opposite effect is observed. SAA has no effect on LTB₄ production, but it induces a strong stimulation of cyclooxygenase-2 expression and PGE₂ production. The molecular mechanisms underlying this differential signalling are not completely understood. It is generally assumed that every agonist–receptor–G protein ternary complex has equal ability to activate the G protein and to transduce intracellular signals. However, GPCRs pass through a collection of conformations and it has been demonstrated that distinct GPCR conformations can stimulate distinct intracellular signals [136]. Distinct ligands are likely to have different efficacy [137]. They recognize specific receptor states and shift the receptor to conformations with different efficiency to produce G protein activation, and different affinity for other partners [138]. For instance, FPRL1 is a promiscuous receptor that recognizes many structurally unrelated ligands susceptible to induce distinct conformations that may condition the intracellular signalling and fate of the receptor. Weak agonists may be sufficiently potent to activate the few intracellular pathways required for chemotaxis but only potent agonists can fully trigger the activation of all the different intracellular pathways which are required to orchestrate a robust superoxide release. Ligands that have a poor efficacy for the production of cell responses

may paradoxically have strong abilities to trigger receptor phosphorylation and internalization. For instance, we have previously observed that the low-affinity peptide WKYMVM has a higher efficacy than the high-affinity peptide WKYMVM for inducing FPRL1 phosphorylation and internalization [18]. Different agonists may also bring about particular FPRL1 conformations that preferentially activate a different G_i subtype of G protein (e.g., G_{i1} or G_{i3}) or a different set of G_{i2} with a particular combination of $\beta\gamma$ subunits. This may result in a differential ability to activate intracellular signalling pathways.

A puzzling observation regarding the behavior of FPR and FPRL1 is that several ligands, including LXA₄, SAA, and annexin I, are capable of inducing pro- and anti-inflammatory activities through the activation of either FPRL1 or FPR. It is not known how some agonists of FPR/FPRL1 can induce contrary signals. One possibility is that the inhibitory signal involves a non-identified receptor that cross-reacts with these agonists. This aspect has been discussed in detail in a recent review in the case of LXA₄ [13] and will not be developed here. It is interesting to note that agonists inducing pro- and anti-inflammatory signals are not among the most potent. They apparently activate distinct signalling pathways at low and high concentrations. This is clearly illustrated in the case of annexin I, which elicits a transient calcium release at low concentrations without fully activating the MAP kinase pathways [52]. This may be sufficient to down-regulate the receptor and cross-desensitize other chemoattractant receptors with, as a primary consequence, the paralysis of phagocytes when further challenged by chemoattractants. Likewise, SAA triggers neutrophil chemotaxis but is a weak inducer of superoxide production. A recent study with human monocytes indicates that SAA stimulates the production of TNF- α and IL-10 which are pro- and anti-inflammatory cytokines, respectively [135]. TNF- α production required the PI3K/p38 pathway, whereas the PI3K/ERK pathway is essential for IL-10 production. TNF- α secretion precedes IL-10, production and requires SAA concentrations around 10 times lower than those necessary for IL-10 production. In addition, the level of IL-10, which is still maximal when TNF- α is declining, may counteract the proinflammatory action of TNF- α . Thus, the differential activation of two signalling pathways that are involved in the production of two cytokines with opposite actions, as well as the concentration dependence and time-lag in their expression, could explain how the same receptor can generate contrary immune responses.

The functional role of a ligand can also vary with the cell type that expresses the receptor. For instance, LXA₄ has been shown to lack the ability to mobilize intracellular calcium in neutrophils, whereas it stimulates an increase of calcium in monocytes [139,140]. This is particularly puzzling because FPRL1 is expressed in both cell types and triggers a robust calcium response in neutrophils and monocytes when occupied by the FPRL1 specific hexapeptide WKYMVM. Likewise, in the case of C5a, opposite effects have been described in neuronal cell death. While C5a mediates apoptosis in neuroblastoma cells [141,142], it antagonizes the neurotoxic effect of the amyloid peptide A β ₄₂ in differentiated neuroblastoma cells

[143,144] and is a potent inhibitor of apoptosis in cultured granule neurons [83].

6. Regulation of chemoattractant receptor functions

6.1. Modulation of signalling

Defining the events that localize and restrict signalling activity is of particular interest in chemotaxis and in the bactericidal activity of leukocytes. The rapid modulation of signalling at the level of the receptor may be critical for the ability of chemoattractant receptors to sense small changes in chemoattractant concentrations as cells move along a chemotactic gradient. Conversely, the attenuation of leukocyte responses such as degranulation and superoxide production is of major importance in controlling inflammation and preventing tissue damage.

6.1.1. Chemoattractant receptor oligomerization

A growing body of biochemical and biological evidence has accumulated recently, which supports the idea that most GPCRs can form dimeric structures or higher order oligomeric complexes (reviewed in Refs. [145–147]). Receptor oligomerization appears to have physiological relevance, as it seems to be an early event in receptor biosynthesis and of critical importance for receptor trafficking. The association of two or more receptors may have consequences for specific signal transduction pathways, thus explaining why a wide variety of responses appear to be differentially regulated via the same receptor. Furthermore, a rapidly increasing number of GPCRs are now demonstrated to form not only homo-dimers but also hetero-dimers. Hetero-dimerization may result in novel agonist specificities and contribute to the modulation of receptor functions.

Different approaches have been used over the years to detect GPCR oligomerization (reviewed in Refs. [145,148]). Separation of membrane proteins by sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), combined with Western blotting and immunodetection, has led to the identification of molecular species of higher molecular mass than expected for receptor monomers. More specific techniques involve the co-immunoprecipitation, with or without cross-linking, of two receptors tagged with different epitopes. New biophysical techniques, such as bioluminescence resonance energy transfer (BRET) and fluorescence resonance energy transfer (FRET), are now available to monitor GPCR oligomerization. The functional effect of oligomerization can be studied with peptides that block dimerization, or by the co-expression of a non-functional mutant with the wild type receptor, or by the co-expression of mutants bearing different mutations.

FRET analyses have shown that the C5aR self-assembles into dimers and higher order oligomers *in vivo* when expressed in *Saccharomyces cerevisiae* [149]. The formation of these oligomers is observed in a standard yeast strain and thus does not require accessory mammalian proteins. The specificity of the oligomerization is supported by the fact that C5aR does not form hetero-dimers with the pheromone receptor present in yeast. Several investigations of GPCR oligomerization

have demonstrated very different effects of ligand binding on the extent of GPCR oligomerization, with an increase, a decrease, or no change, depending on the type of receptor. In the case of C5aR, oligomerization appears to be constitutive, as suggested by the observation that the FRET signal is unaffected by binding of the ligand. Subcellular fractionation studies revealed that FRET occurs to a similar extent in the membrane-enriched fraction and in the endoplasmic reticulum- and Golgi-enriched fraction. These observations suggest that C5aR oligomerization occurs early in the biosynthesis of the receptor and that constitutive oligomers transit through the secretory pathway. Oligomerization may thus be important in the terminal glycosylation of the C5a receptor and for its effective delivery to the cell surface and possibly, to storage organelles, such as secretory vesicles in neutrophils. Thus, C5aR oligomerization may play a key role in the proper cellular targeting of the receptor and in receptor functions.

Unlike C5aR, FPR does not seem to form homo-dimers. Griepentrog et al. [150] have reported that the co-expression of a signalling defective mutant with wild type FPR does not show any inhibitory effect on ligand-induced intracellular calcium release, chemotaxis and activation of the extracellular signal-regulated kinases ERK1/2. Wild type FPR, co-expressed with another mutant that has a defect in receptor endocytosis, is efficiently internalized and fails to correct the mutant defect. However, the possibility that the mutations themselves might prevent receptor dimerization cannot be excluded. In any case, no oligomerization products could be visualized when wild type receptors tagged with different epitopes are co-expressed.

For most GPCRs the domains involved in dimerization remain elusive. Several models have been proposed for GPCR oligomerization [151], incorporating a contact dimerization model in which non-covalent lateral contacts between transmembrane segments of two independently folded receptor monomers maintain the dimeric structure [152]. A disulfide trapping strategy has been used to probe the intermolecular contact surfaces involved in C5aR dimerization [153]. In this study, the cross-linking of C5a receptors is observed not only in transfected mammalian cells but also in human neutrophils. The results suggest two possible helical orientations, a symmetric helix-4 dimer or a helices-1,2-symmetric dimer. However, the participation of a cysteine in the second intracellular loop is not adequately explained by either model and can be best explained by higher order oligomers, like tetramers. A preferential role for helices 1 and 2 in the putative dimerization domain is supported by the identification, by genetic mapping, of transmembrane amino acids critical for C5aR functions [154].

6.1.2. Role of chemoattractant receptors in the desensitization of chemokine receptors

Cell responses to chemotactic factors are tightly controlled by up-regulation through priming or down-regulation by desensitization/internalization (for a review see Ref. [155]). Homologous desensitization occurs when a receptor is occupied by its cognate ligand and phosphorylated by GPCR kinases (GRKs)

[155]. The phosphorylated receptor associates with β -arrestins and undergoes uncoupling from the G protein and internalization. Heterologous desensitization corresponds to a decrease in receptor responsiveness to its ligands following phosphorylation by second messenger-triggered kinases, such as protein kinase C (PKC) or protein kinase A (PKA), that have been activated by other receptors and signalling cascades [156].

C5aR and the *N*-formyl peptide receptors are structurally and functionally closely related to chemokine receptors. Both homo- and hetero-dimerization were demonstrated for CC and CXC chemokine receptors. In a recent study, Huttenrauch et al. [157] have shown that the chemokine receptor CCR5 forms hetero-oligomeric complexes with C5aR. Stimulation of cells co-expressing CCR5 and C5aR with C5a induced cross-phosphorylation of CCR5 not only by well-established PKC-mediated mechanisms, but also by GRKs. These data suggest that unligated CCR5 receptors are substrates for GRKs if they form hetero-complexes with an agonist-activated receptor. Co-expression of C5aR promoted CCR5 co-internalization upon C5aR stimulation. Cross-phosphorylation and co-internalization of unligated CCR5 receptors within hetero-oligomeric complexes thus lead to down-regulation of the chemokine receptor.

Down-regulation of several chemokine receptors by receptors of the FPR family has also been reported. The activation of FPR results in the cross-desensitization of CXCR1 and CXCR2 [156]. Similarly, the activation of either FPR or FPRL1 leads to the desensitization of CCR5 as a result of a PKC-dependent phosphorylation of CCR5 on serine residues [158]. FPRL1 agonists also induce a PKC-dependent phosphorylation of CXCR4 and its down-regulation [159]. There is no information about the ability of FPR and FPRL1 to form hetero-oligomers with chemokine receptors, but heterologous desensitization seems to be mediated, in these cases, by activation of second messengers. The desensitization of other neutrophil/monocyte chemoattractant receptors by FPR and FPRL1 suggests the existence of a hierarchical cross-talk between different groups of receptors.

6.1.3. Receptor clustering

The activation of membrane receptors with a point source of chemoattractant induces a cell polarization that dictates the direction of movement. Polarization of chemoattractant-stimulated leukocytes correlates with an asymmetric redistribution of distinct subtypes of lipid raft domains to the leading (GM1 glycolipid-rich raft domains) and trailing edges (GM3 glycolipid-rich raft domains) [160]. The segregation of lipid rafts may provide an organizing platform for signalling during gradient sensing and cell polarization. After stimulation with a point source of agonist, an enrichment of the C5aR has been observed at the leading edge [161]. This increase in C5aR concentration reflects the accumulation of highly folded plasma membrane ruffles at the leading edge rather than a real accumulation of receptors [161].

The lipid rafts are thought to participate in membrane reorganization during receptor internalization. It has been shown that, following a uniform agonist stimulation, FPR concentrates

into patches/clusters on the plasma membrane in the initial phase of the internalization process [162]. The receptor has been shown to translocate to lipid rafts and to co-localize with GM1 glycolipid-rich domains following ligand binding and prior internalization. Depletion in cholesterol inhibits signalling in response to ligand stimulation, as well as clustering and internalization of the receptor. The fact that FPR clustering is not affected by treatment with pertussis toxin and is still observed with a non-phosphorylatable mutant suggests that clustering precedes receptor phosphorylation and is independent of receptor signalling. However, switching the receptor to an active conformation is required to maintain the receptor in lipid raft domains as evidenced by the fact that an FPR mutant that binds the ligand but is incapable of transitioning to an active state fails to form clusters. In addition, FPR clustering is reversible [162]. Displacement of the ligand from the clustered receptor, by treatment of the cell with an antagonist, results in the loss of clusters and the cessation of signalling activity [162]. Similarly, FPRL1 (personal observation) and C5aR [161] form patches at the plasma membrane. This is observed very shortly after stimulation with a uniform concentration of agonist and before internalization occurs. Receptor clustering may act as a mechanism to assemble signal amplification centres where receptors, G proteins and downstream effectors, by virtue of proximity, can more efficiently and specifically transduce signals. Clusters may also represent specific sites where receptors become phosphorylated and subsequently internalized.

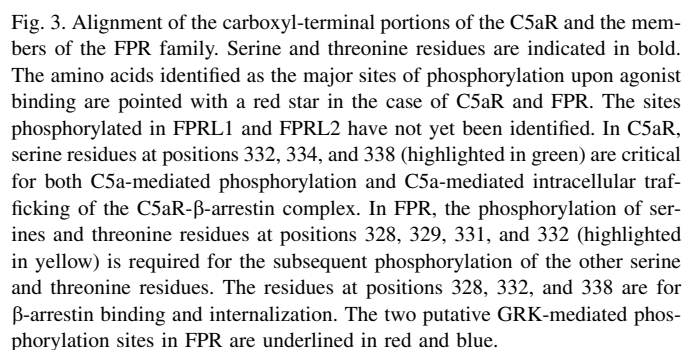
6.2. Receptor inactivation: a multi-step process

Termination of the chemoattractant-mediated responses makes cells refractory to a second stimulation with the same agonist. Several mechanisms that are not mutually exclusive may coexist and be responsible for this loss of responsiveness. It is clearly established that the agonist-mediated phosphorylation of the receptor leads to the high-affinity binding of accessory molecules such as β -arrestins. β -Arrestins sterically interfere with G protein coupling and thereby deactivate receptor signalling. However, this concept has recently been challenged in the case of FPR *in vitro*. Indeed, it has been shown in a soluble reconstituted system that FPR phosphorylation can block the interaction of the G protein independently of β -arrestin binding [163]. In neutrophils, the cytoskeleton is also thought to take part in the deactivation of the FPR-mediated superoxide production through a direct interaction of actin filaments with the C-terminal domain of the receptor [164]. Deactivated receptors, including FPR, FPRL1, and C5aR but not the receptors for IL-8 and the platelet-activating factor, can be reactivated by cytochalasin B, a drug that binds to and blocks the reorganization of actin filaments [165].

6.2.1. Receptor phosphorylation

C5aR and FPR have been shown to become rapidly and differentially phosphorylated in an agonist-, time-, and concentration-dependent manner [166–168]. While FPR phosphorylation is resistant to the PKC inhibitor staurosporin, the phosphorylation of C5aR is partially inhibited. Furthermore,

The β -arrestin-dependent endocytic pathway is commonly used by most G protein-coupled receptors. β -Arrestins link phosphorylated receptors to the components of the endocytic machinery, including clathrin and the clathrin adaptor AP2 [183,184]. Fig. 4 illustrates the classical endocytosis/recycling pathways followed by the majority of GPCRs. The β -arrestins target the agonist-occupied receptor to pre-existing clathrin-coated pits for internalization [185]. The large GTPase, dynamin, is required in the process and plays a key role in the constriction of the coated pits [186]. Clathrin-mediated



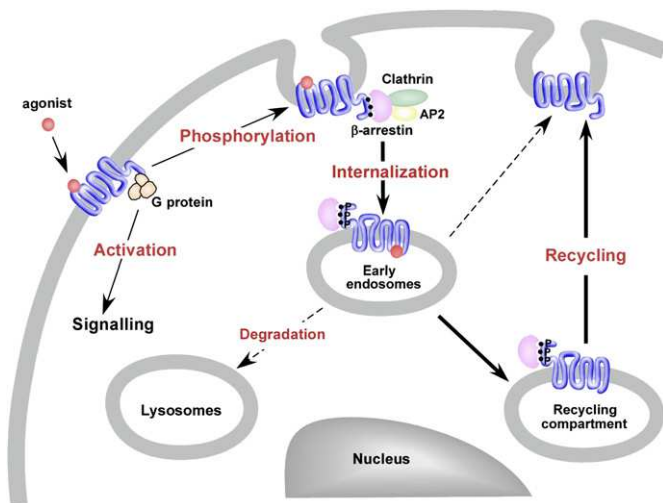


Fig. 4. Intracellular trafficking of activated receptors. Agonist dependent phosphorylation of the receptors leads to the recruitment of β -arrestins. The receptor– β -arrestin complex is targeted to clathrin-coated pits, traffics in early endosomes and accumulates in a perinuclear recycling compartment. After dephosphorylation and dissociation from β -arrestins, the receptors resensitize and recycle to the cell surface. In the case of C5aR, a fraction of the internalized receptor is targeted to lysosomes for degradation.

endocytosis is a common pathway used by GPCRs in many cell types, including myeloid cells. For example, in neutrophils, it has been shown that the ligation of the platelet-activating factor (PAF) to the PAF receptor induces the recruitment of β -arrestin and components of the clathrin-dependent endocytic machinery, namely clathrin heavy chain, α -adaptin, and dynamin [187]. Whether the clathrin-dependent endocytic pathway is the main route followed by chemoattractant receptors in neutrophils is not currently known.

The FPR appears to diverge from this standard model and is capable of using an alternative pathway independent of the action of β -arrestin, dynamin and clathrin [188,189]. Through the characterization of partially phosphorylated mutants, it has been shown that FPR mutants that do not bind β -arrestins are, nevertheless, efficiently internalized [163]. Furthermore, studies with mouse embryonic fibroblasts (MEF) from β -arrestin 1 and 2 double knockout mice [190] have established that phosphorylated FPR internalizes in a β -arrestin-independent manner [189]. Among the formyl peptide receptors, this β -arrestin-independent internalization seems to be a peculiarity of the FPR, as the absence of β -arrestins prevents the internalization of FPRL1 [207]. However, the ability of FPR to be internalized in β -arrestin-deficient cells does not exclude the possibility that a β -arrestin-dependent pathway is involved when β -arrestins associate with the phosphorylated receptor. In β -arrestin-deficient MEF cells, FPR is nevertheless directed to and trapped in the perinuclear recycling compartment [189]. Reconstitution of the β -arrestin-deficient cells with either isoform of β -arrestin restores the return of FPR to the plasma membrane. Recycling thus appears to be β -arrestin-dependent, therefore assigning an expanded role for β -arrestin in receptor trafficking. β -Arrestin binding most likely occurs in the endosomal system, but how β -arrestins regulate the recycling of

FPR is still unknown. In contrast, partially phosphorylated FPR mutants do not require β -arrestins for recycling [180]. A constitutively active form of β -arrestin 2 with high affinity for FPR inhibits the recycling of wild type FPR but not the recycling of a partially unphosphorylatable mutant that displays a low affinity for the constitutively active form of β -arrestin 2 [180]. The inhibition of receptor recycling thus appears to correlate with ability of *N*-formyl peptide, FPR and active β -arrestin 2 to form a stable ternary complex. This also suggests that the pattern of phosphorylation/dephosphorylation of the receptor determined its transport from recycling endosomes back to the plasma membrane.

Agonist-triggered internalization of FPRL1 follows a clathrin-dependent endocytic pathway. Internalization from the plasma membrane into intracellular compartments is prevented by conditions interfering with the formation of clathrin-coated pits or the internalization of clathrin-coated vesicles, such as expression of a dominant-negative clathrin mutant, siRNA-mediated depletion of cellular clathrin, and expression of a dominant-negative mutant of dynamin [191]. Internalized FPRL1 co-localizes with Rab11, indicating trafficking through the perinuclear recycling compartment ([191] and our personal observation). A separate, PI3K-dependent, recycling pathway bypassing perinuclear recycling endosomes has also been observed [191].

Similar to FPR, FPRL1 is associated to β -arrestins in the perinuclear recycling compartment [207]. For a growing number of GPCRs that form a long-lasting complex with β -arrestins, it is established that β -arrestins function as signal transducers to connect the receptors with diverse signalling pathways. β -Arrestins have been demonstrated to bind components of the MAP kinase cascades, leading to their activation [192]. β -Arrestin-mediated scaffolding and activation of MAP kinases appear to be linked to the endocytosis of the receptor– β -arrestin complex. The stable association of the receptor and β -arrestins is thought to stabilize cytosolic activity of phosphorylated ERK1/2, while inhibiting ERK1/2 translocation to the nucleus and nuclear ERK1/2 activity [193]. Several recent studies indicate that ERK1/2 activation through β -arrestins does not apply to chemoattractant receptor signalling. Through the use of a collection of FPR mutants, it has been shown that activation of ERK1/2 is independent of receptor phosphorylation, β -arrestin binding, and receptor endocytosis but is conditioned by the activation of the Gi protein [188,208]. Similarly, we found that FPRL1-mediated ERK1/2 activation is not dependent on β -arrestin and occurs primarily through G protein signalling [207]. Since β -arrestins sequester phosphorylated ERK1/2, preventing nuclear translocation and transcriptional activation, it seems highly beneficial for chemoattractant receptors to signal essentially through the G protein, and not through β -arrestins, to ensure the activation of transcription factors that regulate the synthesis of modulators of inflammatory and immune responses.

It has been originally reported that C5aR was not internalized through clathrin-coated pits [188]. However, more recent studies have provided evidence that the C5aR is internalized via the classical clathrin-dependent pathway [174,194]. In neutrophils and transfected CHO cells, C5aR appears to follow

a route divergent from that followed by the formyl peptide receptors after reaching early endosomes. After long-term exposure to the ligand, the C5aR mainly co-localizes with the late endosomal/lysosomal marker LAMP2, and Western blot analyses revealed that a fraction of C5aR is degraded in lysosomes [194]. Nevertheless, a substantial fraction of the receptor recycles to the plasma membrane in the cell type used in this study. The degradation of internalized C5aR appears to be cell type-dependent, since efficient recycling and the absence of degradation has been observed in RINm5F cells ([173] and Boulay, unpublished results). Thus, depending on the cell type, C5aR appears to be submitted to a differential sorting. Ubiquitination of cytoplasmic lysines in the β_2 -adrenergic receptor is required for its degradation after prolonged exposure to ligand [195] and three lysine residues in the C-terminal domain of C5aR are potential ubiquitination sites. Alternatively, the C5aR might be directed to the degradation pathway through the interaction with lysosomal targeting sorting proteins such as sorting nexin 1, involved in the sorting of the protease-activated receptor PAR1 [196], or the GPCR-associated sorting protein GASP for the δ -opioid receptor [197]. Whatever sorting machinery is used to target a fraction of C5aR to lysosomes, the nature of the structural determinants involved remains to be defined.

7. Conclusion

Since their identification and molecular cloning, a decade ago, a large body of knowledge has accumulated concerning the biological roles, the intracellular signalling, and the regulation of chemoattractant receptors. Their pathophysiological role has been shown to extend beyond host resistance against microbial infection. The ability of FPR to interact with high affinity with agonists derived from pathogens suggests that this receptor plays a critical role in innate immunity. It has been suggested to behave as a pattern recognition receptor. It is puzzling, but perhaps of pathophysiological relevance, as to how this receptor escapes the classical mode of regulation that applies to its homologue FPRL1, and to C5aR. FPR, and especially FPRL1, can now be considered as promiscuous receptors, with affinity for apparently unrelated agonists. The use of FPRL1 by host-derived agonists, and its association with amyloidosis and multiple inflammatory neurodegenerative diseases, indicates that this receptor may play a crucial role in the regulation of the inflammatory process associated with tissue damage and neurodegeneration. Therefore, it seems of importance to consider chemoattractant receptors as potential targets in the search for specific anti-inflammatory drugs and for the development of new therapeutic strategies.

References

- [1] W.A. Marasco, S.H. Phan, H. Krutzsch, H.J. Showell, D.E. Feltner, R. Nairn, E.L. Becker, P.A. Ward, Purification and identification of formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine as the major peptide neutrophil chemotactic factor produced by *Escherichia coli*, *J. Biol. Chem.* 259 (1984) 5430–5439.

- [2] E. Schiffmann, H.V. Showell, B.A. Corcoran, P.A. Ward, E. Smith, E.L. Becker, The isolation and partial characterization of neutrophil chemotactic factors from *Escherichia coli*, *J. Immunol.* 114 (1975) 1831–1837.
- [3] H. Carp, Mitochondrial *N*-formylmethionyl protein as chemoattractants for neutrophils, *J. Exp. Med.* 155 (1982) 264–275.
- [4] R. Ye, F. Boulay, Structure and function of leukocyte chemoattractant receptors, *Adv. Pharmacol.* 39 (1997) 221–290.
- [5] H.J. Showell, R.J. Freer, S.H. Zigmond, E. Schiffmann, S. Aswanikumar, B. Corcoran, E.L. Becker, The structure–activity relations of synthetic peptides as chemotactic factors and inducers of lysosomal enzyme secretion for neutrophils, *J. Exp. Med.* 143 (1976) 1155–1169.
- [6] F. Boulay, M. Tardif, L. Bouchon, P. Vignais, The human *N*-formylpeptide receptor. Characterization of two cDNA isolates and evidence for a new subfamily of G-protein-coupled receptors, *Biochemistry* 29 (1990) 11123–11133.
- [7] F. Boulay, M. Tardif, L. Bouchon, P. Vignais, Synthesis and use of a novel *N*-formyl peptide derivative to isolate a human *N*-formyl peptide receptor cDNA, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 168 (1990) 1103–1109.
- [8] L. Bao, N.P. Gerard, R. Eddy Jr., T.B. Shows, C. Gerard, Mapping of genes for the human C5a receptor (C5aR), human FMLP receptor (FPR), and two FMLP receptor homologue orphan receptors (FPRH1, FPRH2) to chromosome 19, *Genomics* 13 (1992) 437–440.
- [9] P.M. Murphy, T. Ozcelik, R.T. Kenney, H.L. Tiffany, D. McDermott, U. Francke, A structural homologue of the *N*-formyl peptide receptor. Characterization and chromosome mapping of a peptide chemoattractant receptor family, *J. Biol. Chem.* 267 (1992) 7637–7643.
- [10] R.D. Ye, S.L. Cavanagh, O. Quehenberger, E.R. Prossnitz, C.G. Cochrane, Isolation of a cDNA that encodes a novel granulocyte *N*-formyl peptide receptor, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 184 (1992) 582–589.
- [11] S. Fiore, J.F. Maddox, H.D. Perez, C.N. Serhan, Identification of a human cDNA encoding a functional high affinity lipoxin A4 receptor, *J. Exp. Med.* 180 (1994) 253–260.
- [12] N. Chiang, C.N. Serhan, S.E. Dahlen, J.M. Drazen, D.W. Hay, G.E. Rovati, T. Shimizu, T. Yokomizo, C. Brink, The lipoxin receptor ALX: potent ligand-specific and stereoselective actions in vivo, *Pharmacol. Rev.* 58 (2006) 463–487.
- [13] H. Fu, J. Karlsson, J. Bylund, C. Movitz, A. Karlsson, C. Dahlgren, Ligand recognition and activation of formyl peptide receptors in neutrophils, *J. Leukoc. Biol.* 79 (2006) 247–256.
- [14] A. Sahagun-Ruiz, J.S. Colla, J. Juhn, J.L. Gao, P.M. Murphy, D.H. McDermott, Contrasting evolution of the human leukocyte *N*-formylpeptide receptor subtypes FPR and FPRL1R, *Genes Immun.* 2 (2001) 335–342.
- [15] Y. Zhang, R. Syed, C. Uygur, D. Pallos, M.C. Gorry, E. Firatli, J.R. Cortelli, T.E. VanDyke, P.S. Hart, E. Feingold, T.C. Hart, Evaluation of human leukocyte *N*-formylpeptide receptor (FPR1) SNPs in aggressive periodontitis patients, *Genes Immun.* 4 (2003) 22–29.
- [16] K. Wenzel-Seifert, R. Seifert, Functional differences between human formyl peptide receptor isoforms 26, 98, and G6, *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 367 (2003) 509–515.
- [17] A. Betten, J. Bylund, T. Cristophe, F. Boulay, A. Romero, K. Hellstrand, C. Dahlgren, A proinflammatory peptide from *Helicobacter pylori* activates monocytes to induce lymphocyte dysfunction and apoptosis, *J. Clin. Invest.* 108 (2001) 1221–1228.
- [18] T. Christophe, A. Karlsson, C. Dugave, M.J. Rabiet, F. Boulay, C. Dahlgren, The synthetic peptide Trp-Lys-Tyr-Met-Val-Met-NH₂ specifically activates neutrophils through FPRL1/LXA4R and is an agonist for the orphan monocyte-expressed chemoattractant receptor FPRL2, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 21585–21593.
- [19] I. Migeotte, E. Riboldi, J.D. Franssen, F. Gregoire, C. Loison, V. Wittamer, M. Detheux, P. Robberecht, S. Costagliola, G. Vassart, S. Sozzani, M. Parmentier, D. Communi, Identification and characterization of an endogenous chemotactic ligand specific for FPRL2, *J. Exp. Med.* 201 (2005) 83–93.
- [20] I. Migeotte, D. Communi, M. Parmentier, Formyl peptide receptors: a promiscuous subfamily of G protein-coupled receptors controlling immune responses, *Cytokine Growth Factor Rev.* 17 (2006) 501–519.

- [21] R.J. Freer, A.R. Day, J.A. Radding, E. Schiffmann, S. Aswanikumar, H.J. Showell, E.L. Becker, Further studies on the structural requirements for synthetic peptide chemoattractants, *Biochemistry* 19 (1980) 2404–2410.
- [22] C.K. Derian, H.F. Solomon, J.D. Higgins III, M.J. Beblavy, R.J. Santulli, G.J. Bridger, M.C. Pike, D.J. Kroon, A.J. Fischman, Selective inhibition of *N*-formylpeptide-induced neutrophil activation by carbamate-modified peptide analogues, *Biochemistry* 35 (1996) 1265–1269.
- [23] K. Wenzel-Seifert, R. Seifert, Cyclosporin H is a potent and selective formylpeptide receptor antagonist, *J. Immunol.* 150 (1993) 4591–4599.
- [24] K. Wenzel-Seifert, C.M. Hurt, R. Seifert, High constitutive activity of the human formyl peptide receptor, *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 24181–24189.
- [25] J.S. Mills, Peptides derived from HIV-1, HIV-2, Ebola virus, SARS coronavirus and coronavirus 229E exhibit high affinity binding to the formyl peptide receptor, *Biochim. Biophys. Acta* 1762 (2006) 693–703.
- [26] C.J. de Haas, K.E. Veldkamp, A. Peschel, F. Weerkamp, W.J. Van Wamel, E.C. Heezius, M.J. Poppelier, K.P. Van Kessel, J.A. van Strijp, Chemotaxis inhibitory protein of *Staphylococcus aureus*, a bacterial antiinflammatory agent, *J. Exp. Med.* 199 (2004) 687–695.
- [27] C. Prat, J. Bestebroer, C.J. de Haas, J.A. van Strijp, K.P. van Kessel, A new staphylococcal anti-inflammatory protein that antagonizes the formyl peptide receptor-like 1, *J. Immunol.* 177 (2006) 8017–8026.
- [28] B.S. Edwards, C. Bologna, S.M. Young, K.V. Balakin, E.R. Prossnitz, N.P. Savchuck, L.A. Sklar, T.I. Oprea, Integration of virtual screening with high-throughput flow cytometry to identify novel small molecule formylpeptide receptor antagonists, *Mol. Pharmacol.* 68 (2005) 1301–1310.
- [29] Y.S. Bae, H.Y. Lee, E.J. Jo, J.I. Kim, H.K. Kang, R.D. Ye, J.Y. Kwak, S.H. Ryu, Identification of peptides that antagonize formyl peptide receptor-like 1-mediated signaling, *J. Immunol.* 173 (2004) 607–614.
- [30] C.C. Cunningham, R. Vegners, R. Bucki, M. Funaki, N. Korde, J.H. Hartwig, T.P. Stossel, P.A. Janmey, Cell permeant polyphosphoinositide-binding peptides that block cell motility and actin assembly, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 43390–43399.
- [31] H. Fu, L. Bjorkman, P. Janmey, A. Karlsson, J. Karlsson, C. Movitz, C. Dahlgren, The two neutrophil members of the formylpeptide receptor family activate the NADPH-oxidase through signals that differ in sensitivity to a gelsolin derived phosphoinositide-binding peptide, *BMC Cell Biol.* 5 (2004) 50–62.
- [32] S.H. Baek, J.K. Seo, C.-B. Chae, P.-G. Suh, S.H. Ryu, Identification of the peptides that stimulate the phosphoinositide hydrolysis in lymphocytes cell lines from peptide libraries, *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 8170–8175.
- [33] J.K. Seo, S.-Y. Choi, Y. Kim, S.H. Baek, K.-T. Kim, C.-B. Chae, J.D. Lambeth, P.-G. Suh, S.H. Ryu, A peptide with unique receptor specificity, *J. Immunol.* 158 (1997) 1895–1901.
- [34] C. Dahlgren, T. Christophe, F. Boulay, P. Madianos, M.-J. Rabiet, A. Karlson, The synthetic chemoattractant Trp-Lys-Tyr-Met-Val-DMet activates neutrophils preferentially through the lipoxin A4 receptor, *Blood* 95 (2000) 1810–1818.
- [35] Y. Le, W. Gong, B. Li, N.M. Dunlop, W. Shen, S.B. Su, R.D. Ye, J.M. Wang, Utilization of two seven-transmembrane, G protein-coupled receptors, formyl peptide receptor-like 1 and formyl peptide receptor, by synthetic hexapeptide WKYMVm for human phagocyte activation, *J. Immunol.* 163 (1999) 6777–6784.
- [36] C. Klein, J.I. Paul, K. Sauve, M.M. Schmidt, L. Arcangeli, J. Ransom, J. Trueheart, J.P. Manfredi, J.R. Broach, A.J. Murphy, Identification of surrogate agonists for the human FPRL-1 receptor by autocrine selection in yeast, *Nat. Biotechnol.* 16 (1998) 1334–1337.
- [37] Y. Le, S. Jiang, J. Hu, W. Gong, S. Su, N.M. Dunlop, W. Shen, B. Li, J. Ming Wang, N36, a synthetic N-terminal heptad repeat domain of the HIV-1 envelope protein gp41, is an activator of human phagocytes, *Clin. Immunol.* 96 (2000) 236–242.
- [38] S.B. Su, W.H. Gong, J.L. Gao, W.P. Shen, M.C. Grimm, X. Deng, P.M. Murphy, J.J. Oppenheim, J.M. Wang, T20/DP178, an ectodomain peptide of human immunodeficiency virus type 1 gp41, is an activator of human phagocyte *N*-formyl peptide receptor, *Blood* 93 (1999) 3885–3892.
- [39] X. Deng, H. Ueda, S.B. Su, W. Gong, N.M. Dunlop, J.-L. Gao, P.M. Murphy, J.M. Wang, A synthetic peptide derived from human immunodeficiency virus type 1 gp120 downregulates the expression and function of chemokine receptors CCR5 and CXCR4 in monocytes by activating the 7-transmembrane G-protein-coupled receptor FPRL1/LXA4R, *Blood* 94 (1999) 1165–1173.
- [40] W. Shen, P. Proost, B. Li, W. Gong, Y. Le, R. Sargeant, P.M. Murphy, J. Van Damme, J.B. Wang, Activation of the chemotactic peptide receptor FPRL1 in monocytes phosphorylates the chemokine receptor CCR5 and attenuates cell response to selected chemokines, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 272 (2000) 276–283.
- [41] M.J. Rabiet, E. Huet, F. Boulay, Human mitochondria-derived *N*-formylated peptides are novel agonists equally active on FPR and FPRL1, while *Listeria monocytogenes*-derived peptides preferentially activate FPR, *Eur. J. Immunol.* 35 (2005) 2486–2495.
- [42] J. Bylund, T. Christophe, F. Boulay, T. Nystrom, A. Karlsson, C. Dahlgren, Proinflammatory activity of a cecropin-like antibacterial peptide from *Helicobacter pylori*, *Antimicrob. Agents Chemother.* 45 (2001) 1700–1704.
- [43] L. Bellner, F. Thoren, E. Nygren, J.A. Liljeqvist, A. Karlsson, K. Eriksson, A proinflammatory peptide from herpes simplex virus type 2 glycoprotein G affects neutrophil, monocyte, and NK cell functions, *J. Immunol.* 174 (2005) 2235–2241.
- [44] S.B. Su, W. Gong, J.-L. Gao, W. Shen, P.M. Murphy, J.J. Oppenheim, J.M. Wang, A seven-transmembrane, G protein-coupled receptor, FPRL1, mediates the chemotactic activity of serum amyloid A for human phagocytic cells, *J. Exp. Med.* 189 (1999) 395–402.
- [45] Y. Le, W. Gong, H.L. Tiffany, A. Tumanov, S. Nedospasov, W. Shen, N.M. Dunlop, J.L. Gao, P.M. Murphy, J.J. Oppenheim, J.M. Wang, Amyloid (beta)42 activates a G-protein-coupled chemoattractant receptor, FPR-like-1, *J. Neurosci.* 21 (2001) 1–5.
- [46] P. Iribarren, Y. Zhou, J. Hu, Y. Le, J.M. Wang, Role of formyl peptide receptor-like 1 (FPRL1/FPRL2) in mononuclear phagocyte responses in Alzheimer disease, *Immunol. Res.* 31 (2005) 165–176.
- [47] Y. Le, H. Yazawa, W. Gong, Y. Yu, V.J. Ferrans, P.M. Murphy, J.M. Wang, The neurotoxic prion peptide fragment PrP_{106–126} is a chemotactic agonist for the G protein-coupled receptor formyl peptide receptor-like 1, *J. Immunol.* 166 (2001) 1448–1451.
- [48] G. Ying, P. Iribarren, Y. Zhou, W. Gong, N. Zhang, Z.X. Yu, Y. Le, Y. Cui, J.M. Wang, Humanin, a newly identified neuroprotective factor, uses the G protein-coupled formylpeptide receptor-like-1 as a functional receptor, *J. Immunol.* 172 (2004) 7078–7085.
- [49] B. Guo, D. Zhai, E. Cabezas, K. Welsh, S. Nouraini, A.C. Satterthwait, J.C. Reed, Humanin peptide suppresses apoptosis by interfering with Bax activation, *Nature* 423 (2003) 456–461.
- [50] Y. De, Q. Chen, A.P. Schmidt, G.M. Anderson, J.M. Wang, J. Woosters, J.J. Oppenheim, LL-37, the neutrophil granule- and epithelial cell-derived cathelicidin, utilizes formyl peptide receptor-like 1 (FPRL1) as a receptor to chemoattract human blood neutrophils, monocytes, and T cells, *J. Exp. Med.* 192 (2000) 1069–1074.
- [51] R. Sun, P. Iribarren, N. Zhang, Y. Zhou, W. Gong, E.H. Cho, S. Lockett, O. Chertov, F. Bednar, T.J. Rogers, J.J. Oppenheim, J.M. Wang, Identification of neutrophil granule protein cathepsin G as a novel chemotactic agonist for the G protein-coupled formyl peptide receptor, *J. Immunol.* 173 (2004) 428–436.
- [52] A. Walther, K. Riehemann, V. Gerke, A novel ligand of the formyl peptide receptor: annexin I regulates neutrophil extravasation by interacting with the FPR, *Mol. Cell* 5 (2000) 831–840.
- [53] R.P. Hayhoe, A.M. Kamal, E. Solito, R.J. Flower, D. Cooper, M. Perretti, Annexin 1 and its bioactive peptide inhibit neutrophil–endothelium interactions under flow: indication of distinct receptor involvement, *Blood* 107 (2006) 2123–2130.
- [54] J. Karlsson, H. Fu, F. Boulay, C. Dahlgren, K. Hellstrand, C. Movitz, Neutrophil NADPH-oxidase activation by an annexin AI peptide is transduced by the formyl peptide receptor (FPR), whereas an inhibitory signal is generated independently of the FPR family receptors, *J. Leukoc. Biol.* 78 (2005) 762–771.
- [55] Y. Kim, B.D. Lee, O. Kim, Y.S. Bae, T. Lee, P.G. Suh, S.H. Ryu, Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide 27 is a functional ligand for formyl peptide receptor-like 1, *J. Immunol.* 176 (2006) 2969–2975.

- [56] J.L. Gao, E.J. Lee, P.M. Murphy, Impaired antibacterial host defense in mice lacking the *N*-formylpeptide receptor, *J. Exp. Med.* 189 (1999) 657–662.
- [57] F. Boulay, L. Mery, M. Tardif, L. Bouchon, P. Vignais, Expression cloning of a receptor for C5a anaphylatoxin on differentiated HL-60 cells, *Biochemistry* 30 (1991) 2993–2999.
- [58] N.P. Gerard, C. Gerard, The chemotactic receptor for human C5a anaphylatoxin, *Nature* 349 (1991) 614–617.
- [59] C. Gerard, N.P. Gerard, C5A anaphylatoxin and its seven transmembrane-segment receptor, *Annu. Rev. Immunol.* 12 (1994) 775–808.
- [60] F. Marceau, M. Bachvarova, J. Bergeron, D.R. Bachvarov, Characterization of a polymorphism in the coding region of the human C5a anaphylatoxin receptor, *Immunogenetics* 49 (1999) 618–619.
- [61] K.C. Barnes, L. Caraballo, M. Munoz, A. Zambelli-Weiner, E. Ehrlich, M. Burki, S. Jimenez, R.A. Mathias, M.L. Stockton, P. Deindl, L. Mendoza, G.K. Hershey, R. Nickel, M. Wills-Karp, A novel promoter polymorphism in the gene encoding complement component 5 receptor 1 on chromosome 19q13.3 is not associated with asthma and atopy in three independent populations, *Clin. Exp. Allergy* 34 (2004) 736–744.
- [62] L.F. Kolakowski, B. Lu, C. Gerard, N. Gerard, Probing the “message:address” sites for chemoattractant binding to the C5a receptor, *J. Biol. Chem.* 270 (1995) 18077–18082.
- [63] U.E. Höpken, B. Lu, N.P. Gerard, C. Gerard, The C5a chemoattractant receptor mediates mucosal defence to infection, *Nature* 383 (1996) 86–89.
- [64] T.E. Molnes, O.L. Brekke, M. Fung, H. Fure, D. Christiansen, G. Bergseth, V. Videm, K.T. Lappégard, J. Kohl, J.D. Lambris, Essential role of the C5a receptor in *E. coli*-induced oxidative burst and phagocytosis revealed by a novel lepirudin-based human whole blood model of inflammation, *Blood* 100 (2002) 1869–1877.
- [65] B.J. Czermak, V. Sarma, C.L. Pierson, R.L. Warner, M. Huber-Lang, N.M. Bless, H. Schmal, H.P. Friedl, P.A. Ward, Protective effects of C5a blockade in sepsis, *Nat. Med.* 5 (1999) 788–792.
- [66] R.-F. Guo, P.A. Ward, C5a, a therapeutic target in sepsis, *Recent Patents on Anti-Infective Drug Discovery* 1 (2006) 57–65.
- [67] M. Mohr, U. Hopken, M. Oppermann, C. Mathes, K. Goldmann, S. Siever, O. Gotze, H. Burchardi, Effects of anti-C5a monoclonal antibodies on oxygen use in a porcine model of severe sepsis, *Eur. J. Clin. Invest.* 28 (1998) 227–234.
- [68] A.D. Niederbichler, L.M. Hoessel, M.V. Westfall, H. Gao, K.R. Ipaktchi, L. Sun, F.S. Zetoune, G.L. Su, S. Arbabi, J.V. Sarma, S.C. Wang, M.R. Hemmila, P.A. Ward, An essential role for complement C5a in the pathogenesis of septic cardiac dysfunction, *J. Exp. Med.* 203 (2006) 53–61.
- [69] L.M. Hoessel, A.D. Niederbichler, P.A. Ward, Complement-related molecular events in sepsis leading to heart failure, *Mol. Immunol.* 44 (2007) 95–102.
- [70] M. Ohno, T. Hirata, M. Enomoto, T. Araki, H. Ishimaru, T.A. Takahashi, A putative chemoattractant receptor, C5L2, is expressed in granulocyte and immature dendritic cells, but not in mature dendritic cells, *Mol. Immunol.* 37 (2000) 407–412.
- [71] V. Gavrilyuk, S. Kalinin, B.S. Hilbush, A. Middlecamp, S. McGuire, D. Pelligrino, G. Weinberg, D.L. Feinstein, Identification of complement 5a-like receptor (C5L2) from astrocytes: characterization of anti-inflammatory properties, *J. Neurochem.* 92 (2005) 1140–1149.
- [72] S.A. Cain, P.N. Monk, The orphan receptor C5L2 has high affinity binding sites for complement fragments C5a and C5a des-Arg(74), *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 7165–7169.
- [73] S. Okinaga, D. Slattey, A. Humbles, Z. Zsengeller, O. Morteau, M.B. Kinrade, R.M. Brodbeck, J.E. Krause, H.R. Choe, N.P. Gerard, C. Gerard, C5L2, a nonsignaling C5A binding protein, *Biochemistry* 42 (2003) 9406–9415.
- [74] N.P. Gerard, B. Lu, P. Liu, S. Craig, Y. Fujiwara, S. Okinaga, C. Gerard, An anti-inflammatory function for the complement anaphylatoxin C5a-binding protein, C5L2, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 39677–39680.
- [75] Z.D. Konteatis, S.J. Siciliano, G. Van-Riper, C.J. Molineaux, S. Pandya, P. Fischer, H. Rosen, R.A. Mumford, M.S. Springer, Development of C5a receptor antagonists. Differential loss of functional responses, *J. Immunol.* 153 (1994) 4200–4205.
- [76] N.J. Paczkowski, A.M. Finch, J.B. Whitmore, A.J. Short, A.K. Wong, P.N. Monk, S.A. Cain, D.P. Fairlie, S.M. Taylor, Pharmacological characterization of antagonists of the C5a receptor, *Br. J. Pharmacol.* 128 (1999) 1461–1466.
- [77] P.J. Haas, C.J. de Haas, M.J. Poppelier, K.P. van Kessel, J.A. van Strijp, K. Dijkstra, R.M. Scheek, H. Fan, J.A. Kruijtzter, R.M. Liskamp, J. Kemmink, The structure of the C5a receptor-blocking domain of chemotaxis inhibitory protein of *Staphylococcus aureus* is related to a group of immune evasive molecules, *J. Mol. Biol.* 353 (2005) 859–872.
- [78] D. Yang, Q. Chen, S. Stoll, X. Chen, O.M. Howard, J.J. Oppenheim, Differential regulation of responsiveness to fMLP and C5a upon dendritic cell maturation: correlation with receptor expression, *J. Immunol.* 165 (2000) 2694–2702.
- [79] D. Yang, Q. Chen, B. Gertz, R. He, M. Phulsuksombati, R.D. Ye, J.J. Oppenheim, Human dendritic cells express functional formyl peptide receptor-like-2 (FPRL2) throughout maturation, *J. Leukoc. Biol.* 72 (2002) 598–607.
- [80] D. Yang, Q. Chen, Y. Le, J.M. Wang, J.J. Oppenheim, Differential regulation of formyl peptide receptor-like 1 expression during the differentiation of monocytes to dendritic cells and macrophages, *J. Immunol.* 166 (2001) 4092–4098.
- [81] P. Gasque, P. Chan, M. Fontaine, A. Ischenko, M. Lamacz, O. Götze, B.P. Morgan, Identification and characterization of the complement C5a anaphylatoxin receptor on human astrocytes, *J. Immunol.* 155 (1995) 4882–4889.
- [82] M. Lacy, J. Jones, S.R. Whittemore, D.L. Haviland, R.A. Wetsel, S.R. Barnum, Expression of the receptors for the C5a anaphylatoxin, interleukin-8 and fMLP by human astrocytes and microglia, *J. Neuroimmunol.* 61 (1995) 71–78.
- [83] M. Benard, B.J. Gonzalez, M.T. Schouff, A. Falluel-Morel, D. Vaudry, P. Chan, H. Vaudry, M. Fontaine, Characterization of C3a and C5a receptors in rat cerebellar granule neurons during maturation. Neuroprotective effect of C5a against apoptotic cell death, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 43487–43496.
- [84] I.J. Laudes, J.C. Chu, M. Huber-Lang, R.F. Guo, N.C. Riedemann, J.V. Sarma, F. Mahdi, H.S. Murphy, C. Speyer, K.T. Lu, J.D. Lambris, F.S. Zetoune, P.A. Ward, Expression and function of C5a receptor in mouse microvascular endothelial cells, *J. Immunol.* 169 (2002) 5962–5970.
- [85] T. Monsinjon, P. Gasque, P. Chan, A. Ischenko, J.J. Brady, M.C. Fontaine, Regulation by complement C3a and C5a anaphylatoxins of cytokine production in human umbilical vein endothelial cells, *FASEB J.* 17 (2003) 1003–1014.
- [86] I.U. Schraufstatter, K. Trieu, L. Sikora, P. Sriramaraio, R. DiScipio, Complement c3a and c5a induce different signal transduction cascades in endothelial cells, *J. Immunol.* 169 (2002) 2102–2110.
- [87] D.L. Haviland, R.L. McCoy, W.T. Whitehead, H. Akama, E.P. Molmenti, A. Brown, J.C. Haviland, W.C. Parks, D.H. Perlmutter, R.A. Wetsel, Cellular expression of the C5a anaphylatoxin receptor (C5aR): demonstration of C5aR on nonmyeloid cells of the liver and lung, *J. Immunol.* 154 (1995) 1861–1869.
- [88] N.C. Riedemann, R.F. Guo, V.J. Sarma, I.J. Laudes, M. Huber-Lang, R.L. Warner, E.A. Albrecht, C.L. Speyer, P.A. Ward, Expression and function of the C5a receptor in rat alveolar epithelial cells, *J. Immunol.* 168 (2002) 1919–1925.
- [89] M. Daveau, M. Benard, M. Scotte, M.T. Schouff, M. Hiron, A. Francois, J.P. Salier, M. Fontaine, Expression of a functional C5a receptor in regenerating hepatocytes and its involvement in a proliferative signaling pathway in rat, *J. Immunol.* 173 (2004) 3418–3424.
- [90] N.C. Riedemann, R.F. Guo, T.A. Neff, I.J. Laudes, K.A. Keller, V.J. Sarma, M.M. Markiewski, D. Mastellos, C.W. Strey, C.L. Pierson, J.D. Lambris, F.S. Zetoune, P.A. Ward, Increased C5a receptor expression in sepsis, *J. Clin. Invest.* 110 (2002) 101–118.
- [91] D.K. Lee, S.R. George, R. Cheng, T. Nguyen, Y. Liu, M. Brown, K.R. Lynch, B.F. O'Dowd, Identification of four novel human G protein-coupled receptors expressed in the brain, *Brain Res. Mol. Brain Res.* 86 (2001) 13–22.
- [92] G.M. Bokoch, Chemoattractant signaling and leukocyte activation, *Blood* 86 (1995) 1649–1660.

- [93] P. Gierschik, D. Sidoropoulos, K.H. Jakobs, Two distinct Gi-proteins mediate formyl peptide receptor signal transduction in human leukemia (HL-60) cells, *J. Biol. Chem.* 264 (1989) 21470–21473.
- [94] R.C. Tsu, H.W. Lai, R.A. Allen, Y.H. Wong, Differential coupling of the formyl peptide receptor to adenylate cyclase and phospholipase C by the pertussis toxin-insensitive Gz protein, *Biochem. J.* 309 (1995) 331–339.
- [95] T.D. Amatruda, N.P. Gerard, C. Gerard, M.I. Simon, Specific interactions of chemoattractant factor receptors with G-proteins, *J. Biol. Chem.* 268 (1993) 10139–10144.
- [96] R.K. Bommakanti, E.A. Dratz, D.W. Siemsen, A.J. Jesaitis, Extensive contact between Gi2 and *N*-formyl peptide receptor of human neutrophils: mapping of binding sites using receptor-mimetic peptides, *Biochemistry* 34 (1995) 6720–6728.
- [97] E.R. Prossnitz, O. Quehenberger, C.G. Cochrane, R.D. Ye, The role of the third intracellular loop of the neutrophil *N*-formyl peptide receptor in G protein coupling, *Biochem. J.* 294 (1993) 581–587.
- [98] E.R. Prossnitz, R.E. Schreiber, G.M. Bokoch, R.D. Ye, Binding of low affinity *N*-formyl peptide receptors to G protein. Characterization of a novel inactive receptor intermediate, *J. Biol. Chem.* 270 (1995) 10686–10694.
- [99] R.E. Schreiber, E.R. Prossnitz, R.D. Ye, C.G. Cochrane, G.M. Bokoch, Domains of the human neutrophil *N*-formyl peptide receptor involved in G protein coupling, *J. Biol. Chem.* 269 (1994) 326–331.
- [100] M.L. Matsumoto, K. Narzinski, P.D. Kiser, G.V. Nikiforovich, T.J. Baranski, A comprehensive structure–function map of the intracellular surface of the human C5a receptor: I. Identification of critical residues, *J. Biol. Chem.* 282 (2007) 3105–3121.
- [101] M.L. Matsumoto, K. Narzinski, G.V. Nikiforovich, T.J. Baranski, A comprehensive structure–function map of the intracellular surface of the human C5a receptor: II. Elucidation of g protein specificity determinants, *J. Biol. Chem.* 282 (2007) 3122–3133.
- [102] M. Camps, A. Carozzi, P. Schnabel, A. Scheer, P.J. Parker, P. Gierschik, Isozyme-selective stimulation of phospholipase C- β 2 by G protein β -subunits, *Nature* 360 (1992) 684–689.
- [103] B. Stoyanov, S. Volinia, T. Hanck, I. Rubio, M. Loubtchenkov, D. Malek, S. Stoyanova, B. Vanhaesebroeck, R. Dhand, B. Nürnberg, P. Gierschik, K. Seedorf, J.J. Hsuan, M.D. Waterfield, R. Wetzker, Cloning and characterization of a G protein-activated human phosphoinositide-3 kinase, *Science* 269 (1995) 690–693.
- [104] M. Hannigan, L. Zhan, Z. Li, Y. Ai, D. Wu, C.K. Huang, Neutrophils lacking phosphoinositide 3-kinase γ show loss of directionality during *N*-formyl-Met-Leu-Phe-induced chemotaxis, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99 (2002) 3603–3608.
- [105] M.O. Hannigan, C.K. Huang, D.Q. Wu, Roles of PI3K in neutrophil function, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 282 (2004) 165–175.
- [106] E. Hirsch, V.L. Katanaev, C. Garlanda, O. Azzolino, L. Pirola, L. Silengo, S. Sozzani, A. Mantovani, F. Altruda, M.P. Wymann, Central role for G protein-coupled phosphoinositide 3-kinase γ in inflammation, *Science* 287 (2000) 1049–1053.
- [107] M. Tardif, M.-J. Rabiet, T. Christophe, D. Milcent, F. Boulay, Isolation and characterization of a variant HL60 cell line defective in the activation of the NADPH oxidase by phorbol myristate acetate, *J. Immunol.* 161 (1998) 6885–6895.
- [108] L.-T. Tsao, J.-P. Wang, Translocation of protein kinase C isoforms in rat neutrophils, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 234 (1997) 412–418.
- [109] A. Fontayne, P.M. Dang, M.A. Gougerot-Pocidallo, J. El-Benna, Phosphorylation of p47phox sites by PKC α , β II, δ , and ζ : effect on binding to p22phox and on NADPH oxidase activation, *Biochemistry* 41 (2002) 7743–7750.
- [110] L.V. Dekker, M. Leitges, G. Altschuler, N. Mistry, A. McDermott, J. Roes, A.W. Segal, Protein kinase C- β contributes to NADPH oxidase activation in neutrophils, *Biochem. J.* 347 (Pt 1) (2000) 285–289.
- [111] A. von Knethen, A. Tautenhahn, H. Link, D. Lindemann, B. Brune, Activation-induced depletion of protein kinase C α provokes desensitization of monocytes/macrophages in sepsis, *J. Immunol.* 174 (2005) 4960–4965.
- [112] R. He, M. Nanamori, H. Sang, H. Yin, M.C. Dinauer, R.D. Ye, Reconstitution of chemotactic peptide-induced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (reduced) oxidase activation in transgenic COS-phox cells, *J. Immunol.* 173 (2004) 7462–7470.
- [113] M. Lopez-Illasaca, P. Crespo, P.G. Pellici, J.S. Gutkind, R. Wetzker, Linkage of G protein-coupled receptors to the MAPK signaling pathway through PI 3-kinase γ , *Science* 275 (1997) 394–397.
- [114] M.J. Rane, S.L. Carithers, J.M. Arthur, J.B. Klein, K.R. McLeish, Formyl peptide receptor are coupled to multiple mitogen-activated protein kinase cascades by distinct signal transduction pathways, *J. Immunol.* 159 (1997) 5070–5078.
- [115] M. Torres, F.L. Hall, K. O'Neill, Stimulation of human neutrophils with formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine induces tyrosine phosphorylation and activation of distinct mitogen-activated protein-kinases, *J. Immunol.* 150 (1993) 1563–1578.
- [116] Y.C. Ma, J. Huang, S. Ali, W. Lowry, X.Y. Huang, Src tyrosine kinase is a novel direct effector of G proteins, *Cell* 102 (2000) 635–646.
- [117] L.-L. Lin, M. Wartmann, A.Y. Lyn, J.L. Knopf, A. Seth, R.J. Davis, cPLA $_2$ is phosphorylated and activated by MAP kinase, *Cell* 72 (1993) 269–278.
- [118] R. Dana, T.L. Leto, H.L. Malech, R. Levy, Essential requirement of cytosolic phospholipase A $_2$ for activation of the phagocyte NADPH oxidase, *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 441–445.
- [119] B.B. Rubin, G.P. Downey, A. Koh, N. Degousse, F. Ghomashchi, L. Nallan, E. Stefanski, D.W. Harkin, C. Sun, B.P. Smart, T.F. Lindsay, V. Cherepanov, E. Vachon, D. Kelvin, M. Sadilek, G.E. Brown, M.B. Yaffe, J. Plumb, S. Grinstein, M. Glogauer, M.H. Gelb, Cytosolic phospholipase A $_2$ - α is necessary for platelet-activating factor biosynthesis, efficient neutrophil-mediated bacterial killing, and the innate immune response to pulmonary infection: cPLA $_2$ - α does not regulate neutrophil NADPH oxidase activity, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 7519–7529.
- [120] C. Kim, C.C. Marchal, J. Penninger, M.C. Dinauer, The hemopoietic Rho/Rac guanine nucleotide exchange factor Vav1 regulates *N*-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine-activated neutrophil functions, *J. Immunol.* 171 (2003) 4425–4430.
- [121] H.C. Welch, W.J. Coadwell, C.D. Ellison, G.J. Ferguson, S.R. Andrews, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst, P.T. Hawkins, L.R. Stephens, P-Rex1, a PtdIns(3,4,5)P $_3$ - and Gbetagamma-regulated guanine-nucleotide exchange factor for Rac, *Cell* 108 (2002) 809–821.
- [122] F. Sanchez-Madrid, M.A. del Pozo, Leukocyte polarization in cell migration and immune interactions, *EMBO J.* 18 (1999) 501–511.
- [123] M.C. Dinauer, Regulation of neutrophil function by Rac GTPases, *Curr. Opin. Hematol.* 10 (2003) 8–15.
- [124] M. Symons, J.M. Derry, B. Karlak, S. Jiang, V. Lemahieu, F. McCormick, U. Francke, A. Abo, Wiskott–Aldrich syndrome protein, a novel effector for the GTPase CDC42Hs, is implicated in actin polymerization, *Cell* 84 (1996) 723–734.
- [125] L.M. Machesky, K.L. Gould, The Arp2/3 complex: a multifunctional actin organizer, *Curr. Opin. Cell Biol.* 11 (1999) 117–121.
- [126] M. Tardif, L. Brouchon, M.J. Rabiet, F. Boulay, Direct binding of a fragment of the Wiskott–Aldrich syndrome protein to the C-terminal end of the anaphylatoxin C5a receptor, *Biochem. J.* 372 (2003) 453–463.
- [127] R. Boxio, C. Bossenmeyer-Pourie, R. Vanderesse, C. Dournon, O. Nüsse, The immunostimulatory peptide WKYMVm-NH activates bone marrow mouse neutrophils via multiple signal transduction pathways, *Scand. J. Immunol.* 62 (2005) 140–147.
- [128] S. Partida-Sanchez, D.A. Cockayne, S. Monard, E.L. Jacobson, N. Oppenheimer, B. Garvy, K. Kusser, S. Goodrich, M. Howard, A. Harmsen, T.D. Randall, F.E. Lund, Cyclic ADP-ribose production by CD38 regulates intracellular calcium release, extracellular calcium influx and chemotaxis in neutrophils and is required for bacterial clearance *in vivo*, *Nat. Med.* 7 (2001) 1209–1216.
- [129] S. Partida-Sanchez, P. Iribarren, M.E. Moreno-Garcia, J.L. Gao, P.M. Murphy, N. Oppenheimer, J.M. Wang, F.E. Lund, Chemotaxis and calcium responses of phagocytes to formyl peptide receptor ligands is differentially regulated by cyclic ADP ribose, *J. Immunol.* 172 (2004) 1896–1906.
- [130] A.H. Guse, C.P. da Silva, I. Berg, A.L. Skapenko, K. Weber, P. Heyer, M. Hohenegger, G.A. Ashamu, H. Schulze-Koops, B.V. Potter,

- G.W. Mayr, Regulation of calcium signalling in T lymphocytes by the second messenger cyclic ADP-ribose, *Nature* 398 (1999) 70–73.
- [131] H.C. Lee, Physiological functions of cyclic ADP-ribose and NAADP as calcium messengers, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 41 (2001) 317–345.
- [132] J. Karlsson, H. Fu, F. Boulay, J. Bylund, C. Dahlgren, The peptide Trp-Lys-Tyr-Met-Val-D-Met activates neutrophils through the formyl peptide receptor only when signaling through the formylpeptide receptor like 1 is blocked. A receptor switch with implications for signal transduction studies with inhibitors and receptor antagonists, *Biochem. Pharmacol.* 71 (2006) 1488–1496.
- [133] Y.S. Bae, H.J. Yi, H.Y. Lee, E.J. Jo, J.I. Kim, T.G. Lee, R.D. Ye, J.Y. Kwak, S.H. Ryu, Differential activation of formyl peptide receptor-like 1 by peptide ligands, *J. Immunol.* 171 (2003) 6807–6813.
- [134] H.Y. Lee, S.H. Jo, C. Lee, S.H. Baek, Y.S. Bae, Differential production of leukotriene B4 or prostaglandin E2 by WKYMVm or serum amyloid A via formyl peptide receptor-like 1, *Biochem. Pharmacol.* 72 (2006) 860–868.
- [135] H.Y. Lee, M.K. Kim, K.S. Park, E.H. Shin, S.H. Jo, S.D. Kim, E.J. Jo, Y.N. Lee, C. Lee, S.H. Baek, Y.S. Bae, Serum amyloid A induces contrary immune responses via formyl peptide receptor-like 1 in human monocytes, *Mol. Pharmacol.* 70 (2006) 241–248.
- [136] T. Palanche, B. Ilien, S. Zoffmann, M.P. Reck, B. Bucher, S.J. Edelstein, J.L. Galzi, The neurokinin A receptor activates calcium and cAMP responses through distinct conformational states, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 34853–34861.
- [137] T. Kenakin, Efficacy at G-protein-coupled receptors, *Nat. Rev. Drug Discov.* 1 (2002) 103–110.
- [138] T. Kenakin, Drug efficacy at G protein-coupled receptors, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 42 (2002) 349–379.
- [139] M. Romano, J.F. Maddox, C.N. Serhan, Activation of human monocytes and the acute monocytic leukemia cell line (THP-1) by lipoxins involves unique signaling pathways for lipoxin A4 versus lipoxin B4: evidence for differential Ca²⁺ mobilization, *J. Immunol.* 157 (1996) 2149–2154.
- [140] J.F. Maddox, M. Hachicha, T. Takano, N.A. Petasis, V.V. Fokin, C.N. Serhan, Lipoxin A4 stable analogs are potent mimetics that stimulate human monocytes and THP-cells via a G-protein-linked lipoxin A4 receptor, *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 6972–6978.
- [141] I. Farkas, L. Baranyi, Z.S. Liposits, T. Yamamoto, H. Okada, Complement C5a anaphylatoxin fragment causes apoptosis in TGW neuroblastoma cells, *Neuroscience* 86 (1998) 903–911.
- [142] I. Farkas, M. Takahashi, A. Fukuda, N. Yamamoto, H. Akatsu, L. Baranyi, H. Tateyama, T. Yamamoto, N. Okada, H. Okada, Complement C5a receptor-mediated signaling may be involved in neurodegeneration in Alzheimer's disease, *J. Immunol.* 170 (2003) 5764–5771.
- [143] P. Mukherjee, G.M. Pasinetti, The role of complement anaphylatoxin C5a in neurodegeneration: implications in Alzheimer's disease, *J. Neuroimmunol.* 105 (2000) 124–130.
- [144] P. Mukherjee, G.M. Pasinetti, Complement anaphylatoxin C5a neuroprotects through mitogen-activated protein kinase-dependent inhibition of caspase 3, *J. Neurochem.* 77 (2001) 43–49.
- [145] M. Bai, Dimerization of G-protein-coupled receptors: roles in signal transduction, *Cell. Signal.* 16 (2004) 175–186.
- [146] P.S. Park, S. Filipek, J.W. Wells, K. Palczewski, Oligomerization of G protein-coupled receptors: past, present, and future, *Biochemistry* 43 (2004) 15643–15656.
- [147] S.P. Lee, B.F. O'Dowd, S.R. George, Homo- and hetero-oligomerization of G protein-coupled receptors, *Life Sci.* 74 (2003) 173–180.
- [148] S. Angers, A. Salahpour, M. Bouvier, Dimerization: an emerging concept for G protein-coupled receptor ontogeny and function, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 42 (2002) 409–435.
- [149] D.H. Floyd, A. Geva, S.P. Bruinsma, M.C. Overton, K.J. Blumer, T.J. Baranski, C5a receptor oligomerization. II. Fluorescence resonance energy transfer studies of a human G protein-coupled receptor expressed in yeast, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 35354–35361.
- [150] J.M. Gripenot, K.P. Kantele, A.J. Jesaitis, H.M. Miettinen, Experimental evidence for lack of homodimerization of the G protein-coupled human *N*-formyl peptide receptor, *J. Immunol.* 171 (2003) 3187–3193.
- [151] G. Milligan, Oligomerisation of G-protein-coupled receptors, *J. Cell Sci.* 114 (2001) 1265–1271.
- [152] J.Y. Springael, E. Urizar, M. Parmentier, Dimerization of chemokine receptors and its functional consequences, *Cytokine Growth Factor Rev.* 16 (2005) 611–623.
- [153] J.M. Kico, T.B. Lassere, T.J. Baranski, C5a receptor oligomerization. I. Disulfide trapping reveals oligomers and potential contact surfaces in a G protein-coupled receptor, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 35345–35353.
- [154] A. Geva, T.B. Lassere, O. Lichtarge, S.K. Pollitt, T.J. Baranski, Genetic mapping of the human C5a receptor. Identification of transmembrane amino acids critical for receptor function, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 35393–35401.
- [155] J.A. Pitcher, N.J. Freedman, R.J. Lefkowitz, G protein-coupled receptor kinases, *Annu. Rev. Biochem.* 67 (1998) 653–692.
- [156] H. Ali, R.M. Richardson, B. Haribabu, R. Snyderman, Chemoattractant receptor cross-desensitization, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 6027–6030.
- [157] F. Huttenrauch, B. Pollok-Kopp, M. Oppermann, G protein-coupled receptor kinases promote phosphorylation and beta-arrestin-mediated internalization of CCR5 homo- and hetero-oligomers, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 37503–37515.
- [158] W. Shen, B. Li, M.A. Wetzel, T.J. Rogers, E.E. Henderson, S.B. Su, W. Gong, Y. Le, R. Sargeant, D.S. Dimitrov, J.J. Oppenheim, J.M. Wang, Down-regulation of the chemokine receptor CCR5 by activation of chemotactic formyl peptide receptor in human monocytes, *Blood* 96 (2000) 2887–2894.
- [159] B.Q. Li, M.A. Wetzel, J.A. Mikovits, E.E. Henderson, T.J. Rogers, W. Gong, Y. Le, F.W. Ruscetti, J.M. Wang, The synthetic peptide WKYMVm attenuates the function of the chemokine receptors CCR5 and CXCR4 through activation of formyl peptide receptor-like 1, *Blood* 97 (2001) 2941–2947.
- [160] C. Gomez-Mouton, R.A. Lacalle, E. Mira, S. Jimenez-Baranda, D.F. Barber, A.C. Carrera, A.C. Martinez, S. Manes, Dynamic redistribution of raft domains as an organizing platform for signaling during cell chemotaxis, *J. Cell Biol.* 164 (2004) 759–768.
- [161] G. Servant, O.D. Weiner, E.R. Neptune, J.W. Sedat, H.R. Bourne, Dynamics of a chemoattractant receptor in living neutrophils during chemotaxis, *Mol. Biol. Cell* 10 (1999) 1163–1178.
- [162] M. Xue, C.M. Vines, T. Buranda, D.F. Cimino, T.A. Bennett, E.R. Prossnitz, *N*-formyl peptide receptors cluster in an active Raft-associated state prior to phosphorylation, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 45175–45184.
- [163] T.A. Bennett, T.D. Foutz, V.V. Gurevich, L.A. Sklar, E.R. Prossnitz, Partial phosphorylation of the *N*-formyl peptide receptor inhibits G protein association independent of arrestin binding, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 49195–49203.
- [164] A.J. Jesaitis, K.N. Klotz, Cytoskeletal regulation of chemotactic receptors: molecular complexation of *N*-formyl peptide receptors with G proteins and actin, *Eur. J. Haematol.* 51 (1993) 288–293.
- [165] J. Bylund, A. Bjorstad, D. Granfeldt, A. Karlsson, C. Woschnagg, C. Dahlgren, Reactivation of formyl peptide receptors triggers the neutrophil NADPH-oxidase but not a transient rise in intracellular calcium, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 30578–30586.
- [166] M. Tardif, L. Mery, L. Brouchon, F. Boulay, Agonist-dependent phosphorylation of *N*-formylpeptide and activation peptide from the fifth component of C (C5a) chemoattractant receptors in differentiated HL60 cells, *J. Immunol.* 150 (1993) 3534–3545.
- [167] H. Ali, R.M. Richardson, E.D. Tomhave, J.R. Didsbury, R. Snyderman, Differences in phosphorylation of formylpeptide and C5a chemoattractant receptors correlate with differences in desensitization, *J. Biol. Chem.* 268 (1993) 24247–24254.
- [168] E. Giannini, F. Boulay, Phosphorylation, dephosphorylation, and recycling of the C5a receptor in differentiated HL60 cells, *J. Immunol.* 154 (1995) 4055–4064.
- [169] E. Giannini, L. Brouchon, F. Boulay, Identification of the major phosphorylation sites in human C5a anaphylatoxin receptor *in vivo*, *J. Biol. Chem.* 270 (1995) 19166–19172.

- [170] P. Langkabel, J. Zwirner, M. Oppermann, Ligand-induced phosphorylation of anaphylatoxin receptors C3aR and C5aR is mediated by G protein-coupled receptor kinases, *Eur. J. Immunol.* 29 (1999) 3035–3046.
- [171] M.D. Milcent, T. Christophe, M.-J. Rabiet, M. Tardif, F. Boulay, Overexpression of wild-type and catalytically inactive forms of GRK2 and GRK6 fails to alter the agonist-induced phosphorylation of the C5a receptor (CD88): evidence that GRK6 is autophosphorylated in COS-7 cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 259 (1999) 224–229.
- [172] T. Christophe, M.-J. Rabiet, M. Tardif, M.-D. Milcent, F. Boulay, Human complement 5a (C5a) anaphylatoxin receptor (CD88) phosphorylation sites and their specific role in receptor phosphorylation and attenuation of G protein-mediated responses, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 1656–1664.
- [173] N. Naik, E. Giannini, L. Bouchon, F. Boulay, Internalization and recycling of the C5a anaphylatoxin receptor: evidence that the agonist-mediated internalization is modulated by phosphorylation of the C-terminal domain, *J. Cell Sci.* 110 (1997) 2381–2390.
- [174] L. Braun, T. Christophe, F. Boulay, Phosphorylation of key serine residues is required for internalization of the complement 5a (C5a) anaphylatoxin receptor via a beta-arrestin, dynamin, and clathrin-dependent pathway, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 4277–4285.
- [175] E.R. Prossnitz, C.M. Kim, J.L. Benovic, R.D. Ye, Phosphorylation of the *N*-formyl peptide receptor carboxyl terminus by the G protein-coupled receptor kinase, GRK2, *J. Biol. Chem.* 270 (1995) 1130–1137.
- [176] D.C. Maestas, R.M. Potter, E.R. Prossnitz, Differential phosphorylation paradigms dictate desensitization and internalization of the *N*-formyl peptide receptor, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 29791–29795.
- [177] J.J. Onorato, K. Palczewski, J.W. Regan, M.G. Caron, R.J. Lefkowitz, J.L. Benovic, Role of acidic amino acids in peptide substrates of the b-adrenergic receptor kinase and rhodopsin kinase, *Biochemistry* 30 (1991) 5118–5125.
- [178] R.M. Potter, D.C. Maestas, D.F. Cimino, E.R. Prossnitz, Regulation of *N*-formyl peptide receptor signaling and trafficking by individual carboxyl-terminal serine and threonine residues, *J. Immunol.* 176 (2006) 5418–5425.
- [179] T.A. Key, T.D. Foutz, V.V. Gurevich, L.A. Sklar, E.R. Prossnitz, *N*-formyl peptide receptor phosphorylation domains differentially regulate arrestin and agonist affinity, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 4041–4047.
- [180] T.A. Key, C.M. Vines, B.M. Wagener, V. Gurevich, L.A. Sklar, E. Prossnitz, Inhibition of chemoattractant *N*-formyl peptide receptor trafficking by active arrestins, *Traffic* 6 (2005) 1–13.
- [181] M. Han, V.V. Gurevich, S.A. Vishnivetskiy, P.B. Sigler, C. Schubert, Crystal structure of beta-arrestin at 1.9 Å: possible mechanism of receptor binding and membrane translocation, *Structure (Camb.)* 9 (2001) 869–880.
- [182] S.K. Milano, H.C. Pace, Y.M. Kim, C. Brenner, J.L. Benovic, Scaffold functions of arrestin-2 revealed by crystal structure and mutagenesis, *Biochemistry* 41 (2002) 3321–3328.
- [183] O.B. Goodman, J.G.J. Krupnick, F. Santini, V.V. Gurevich, R.B. Penn, A.W. Gagnon, J.H. Keen, J.L. Benovic, b-Arrestin acts as a clathrin adaptor in endocytosis of the b2-adrenergic receptor, *Nature* 383 (1996) 447–450.
- [184] S.A. Laporte, R.H. Oakley, J.A. Holt, L.S. Barak, M.G. Caron, The interaction of beta-arrestin with the AP-2 adaptor is required for the clustering of beta 2-adrenergic receptor into clathrin-coated pits, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 23120–23126.
- [185] M.G. Scott, A. Benmerah, O. Muntaner, S. Marullo, Recruitment of activated G protein-coupled receptors to pre-existing clathrin-coated pits in living cells, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 3552–3559.
- [186] H. Damke, Dynamin and receptor-mediated endocytosis, *FEBS Lett.* 389 (1996) 48–51.
- [187] N.J. McLaughlin, A. Banerjee, M.R. Kelher, F. Gamboni-Robertson, C. Hamiel, F.R. Sheppard, E.E. Moore, C.C. Silliman, Platelet-activating factor-induced clathrin-mediated endocytosis requires beta-arrestin-1 recruitment and activation of the p38 MAPK signalosome at the plasma membrane for actin bundle formation, *J. Immunol.* 176 (2006) 7039–7050.
- [188] T.L. Gilbert, T.A. Bennett, D.C. Maestas, D.F. Cimino, E.R. Prossnitz, Internalization of the human *N*-formyl peptide and C5a chemoattractant receptors occurs via clathrin-independent mechanisms, *Biochemistry* 40 (2001) 3467–3475.
- [189] C.M. Vines, C.M. Revankar, D.C. Maestas, L.L. LaRusch, D.F. Cimino, T.A. Kohout, R.J. Lefkowitz, E.R. Prossnitz, *N*-formyl peptide receptors internalize but do not recycle in the absence of arrestins, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 41581–41584.
- [190] T.A. Kohout, F.S. Lin, S.J. Perry, D.A. Conner, R.J. Lefkowitz, beta-Arrestin 1 and 2 differentially regulate heptahelical receptor signaling and trafficking, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98 (2001) 1601–1606.
- [191] S. Ernst, N. Zobiack, K. Boecker, V. Gerke, U. Rescher, Agonist-induced trafficking of the low-affinity formyl peptide receptor FPR1, *Cell. Mol. Life Sci.* 61 (2004) 1684–1692.
- [192] R.J. Lefkowitz, E.J. Whalen, beta-Arrestins: traffic cops of cell signaling, *Curr. Opin. Cell Biol.* 16 (2004) 162–168.
- [193] S.K. Shenoy, R.J. Lefkowitz, Receptor-specific ubiquitination of beta-arrestin directs assembly and targeting of seven-transmembrane receptor signalosomes, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 15315–15324.
- [194] E.S. Suvorova, J.M. Gripenroeg, H.M. Miettinen, Different endocytosis pathways of the C5a receptor and the *N*-formyl peptide receptor, *Traffic* 6 (2005) 100–115.
- [195] S.K. Shenoy, P.H. McDonald, T.A. Kohout, R.J. Lefkowitz, Regulation of receptor fate by ubiquitination of activated beta 2-adrenergic receptor and beta-arrestin, *Science* 294 (2001) 1307–1313.
- [196] Y. Wang, Y. Zhou, K. Szabo, C.R. Haft, J. Trejo, Down-regulation of protease-activated receptor-1 is regulated by sorting nexin 1, *Mol. Biol. Cell* 13 (2002) 1965–1976.
- [197] J.L. Whistler, J. Enquist, A. Marley, J. Fong, F. Gladher, P. Tsuruda, S.R. Murray, M. Von Zastrow, Modulation of postendocytic sorting of G protein-coupled receptors, *Science* 297 (2002) 615–620.
- [198] Y. Zhou, X. Bian, Y. Le, W. Gong, J. Hu, X. Zhang, L. Wang, P. Iribarren, R. Salcedo, O.M. Howard, W. Farrar, J.M. Wang, Formyl-peptide receptor FPR and the rapid growth of malignant human gliomas, *J. Natl. Cancer Inst.* 97 (2005) 823–835.
- [199] R. McCoy, D.L. Haviland, E.P. Molmenti, T. Ziambaras, R.A. Wetsel, D.H. Perlmuter, *N*-formylpeptide and complement C5a receptors are expressed in liver cells and mediate hepatic acute phase gene regulation, *J. Exp. Med.* 182 (1995) 207–217.
- [200] P. Anton, J. O'Connell, D. O'Connell, L. Whitaker, G.C. O'Sullivan, J.K. Collins, F. Shanahan, Mucosal subepithelial binding sites for the bacterial chemotactic peptide, formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine (FMLP), *Gut* 42 (1998) 374–379.
- [201] E.L. Becker, F.A. Forouhar, M.L. Grunnet, F. Boulay, M. Tardif, B.-J. Bormann, D. Sodja, R.D. Ye, J.R. Woska Jr., P.M. Murphy, Broad immunocytochemical localization of the formylpeptide receptor in human organs, tissues, and cells, *Cell Tissue Res.* 292 (1998) 129–135.
- [202] K. Gronert, A. Gewirtz, J.L. Madara, C.N. Serhan, Identification of a human enterocyte lipoxin A4 receptor that is regulated by interleukin (IL)-13 and interferon γ and inhibits tumor necrosis factor α -induced IL-8 release, *J. Exp. Med.* 187 (1998) 1285–1294.
- [203] M. Keitoku, M. Kohzaki, H. Katoh, M. Funakoshi, S. Suzuki, M. Takeuchi, A. Karbe, S. Horiguchi, J. Watanabe, S. Satoh, M. Nose, K. Abe, H. Okayama, K. Shirato, FMLP actions and its binding sites in isolated human coronary arteries, *J. Mol. Cell. Cardiol.* 29 (1997) 881–894.
- [204] Y. Le, J. Hu, W. Gong, W. Shen, B. Li, N.M. Dunlop, D.O. Halverson, D.G. Blair, J.M. Wang, Expression of functional formyl peptide receptors by human astrocytoma cell lines, *J. Neuroimmunol.* 111 (2000) 102–108.
- [205] A.A. Floreani, A.J. Heires, L.A. Welniak, A. Miller-Lindholm, L. Clark-Pierce, S.I. Rennard, E.L. Morgan, S.D. Sanderson, Expression of receptors for C5a anaphylatoxin (CD88) on human bronchial epithelial cells: enhancement of C5a-mediated release of IL-8 upon exposure to cigarette smoke, *J. Immunol.* 160 (1998) 5073–5081.
- [206] J. Van Beek, M. Bernaudin, E. Petit, P. Gasque, A. Nouvelot, E.T. MacKenzie, M. Fontaine, Expression of receptors for complement anaphylatoxins C3a and C5a following permanent focal cerebral ischemia in the mouse, *Exp. Neurol.* 161 (2000) 373–382.
- [207] E. Huet, M.-J. Rabiet, S. Barral, F. Boulay, The role of beta-arrestins in the formyl peptide receptor-like 1 internalization and signaling, submitted for publication.
- [208] J.M. Gripenroeg, H.M. Miettinen, Activation and nuclear translocation of ERK1/2 by the formyl peptide receptor is regulated by G protein and is not dependent on beta-arrestin translocation or receptor endocytosis, *Cell Signal* 17 (2005) 1300–1311.

ANNEXE E

Huet, E., Boulay, F., Barral, S. and Rabiet, M.J.

(2007)

***Cell. Signal.*, In Press**

**The role of beta-arrestins in the formyl peptide
receptor-like 1 internalization and signaling**



The role of β -arrestins in the formyl peptide receptor-like 1 internalization and signaling

Emilie Huet, François Boulay, Sophie Barral, Marie-Josèphe Rabiet*

Commissariat à l'Energie Atomique (CEA), DSV, iRSTV, Laboratoire de Biochimie et de Biophysique des Systèmes Intégrés (LBBSI), Grenoble, F-38054, France
Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), UMR 5092, 17 rue des Martyrs, Grenoble F-38054, France. Université Joseph Fourier, Grenoble, F-38000, France

Received 3 April 2007; received in revised form 15 May 2007; accepted 15 May 2007

Abstract

The N-formyl peptide receptor-like 1 (FPRL1) is a G protein-coupled receptor (GPCR) that transmits intracellular signals in response to a variety of agonists, many of them being clearly implicated in human pathology. β -arrestins are adaptor proteins that uncouple GPCRs from G protein and regulate receptor internalization. They can also function as signal transducers through the scaffolding of signaling molecules, such as components of the extracellular signal-regulated kinase (ERK) cascade. We investigated the role of β -arrestins in ligand-induced FPRL1 internalization and signaling. In HEK293 cells expressing FPRL1, fluorescence microscopy revealed that agonist-stimulated FPRL1 remained colocalized with β -arrestins during endocytosis. Internalization of FPRL1, expressed in a mouse embryonic fibroblast (MEF) cell line lacking endogenous β -arrestins, was highly compromised. This distinguishes FPRL1 from the prototypical formyl peptide receptor FPR that is efficiently internalized in the absence of β -arrestins. In both HEK293 and MEF cells, FPRL1-mediated ERK1/2 activation was a rapid and transient event. The kinetics and extent of ERK1/2 activation were not significantly modified by β -arrestin overexpression. The pattern of FPRL1-mediated ERK1/2 activation was similar whether cells express or not β -arrestins. Furthermore, treatment of the FPRL1 expressing cells with pertussis toxin inhibited ERK1/2 activation in MEF and in HEK293 cells. These results led us to conclude that activation of ERK1/2 mediated by FPRL1 occurs primarily through G protein signaling. Since β -arrestin-mediated signaling has been observed essentially for receptors coupled to G proteins other than G_i , this may be a characteristic of G_i protein-coupled chemoattractant receptors.

© 2007 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Chemoattractant receptor; β -arrestin; Internalization; Signal transduction

1. Introduction

The recruitment of leukocytes to sites of inflammation and infection is mediated by bacterial and host-derived chemotactic factors that regulate leukocyte extravasation from the blood vessel and migration within the tissue. Ultimately, they activate microbicidal and cytotoxic functions through both the release of proteolytic enzymes from specific granules and the generation of superoxide anions by the phagocyte nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) oxidase. Chemotactic factors

bind to specific heterotrimeric G protein-coupled receptors (GPCRs) on the leukocyte surface. These receptors include the N-formyl peptide receptors (FPR, FPRL1 and FPRL2), and the complement anaphylatoxin C5a receptor (C5aR). The chemoattractant receptor FPRL1 (Formyl Peptide Receptor-Like 1), also known as the lipoxin A4 receptor (LXA4R) [1], shares 69% amino acid identity with the prototypical N-formyl peptide receptor FPR [2], and is expressed in many cell types other than myeloid cells [3–5]. Recently, FPRL1 has emerged as a promiscuous receptor that transmits intracellular signals in response to a variety of agonists. Consequently, besides its FPR-like role in leukocyte-mediated inflammatory responses, a role for FPRL1 in several human pathologies, including neurodegenerative processes, has been suggested [3,6].

Like the other GPCRs, chemoattractant receptors signal through heterotrimeric G proteins. In the general pathway of

* Corresponding author. Laboratoire de Biochimie et de Biophysique des Systèmes Intégrés (UMR 5092), Institut de Recherches en Technologies et Sciences pour le Vivant, CEA Grenoble, 17 rue des Martyrs, 38054 Grenoble Cedex 9, France. Tel.: +33 438 78 31 38; fax: +33 0438 78 51 85.

E-mail address: marie-josephe.rabiet@cea.fr (M.-J. Rabiet).

GPCR regulation, receptor stimulation leads to the dissociation of cognate G proteins, receptor phosphorylation by G protein-coupled receptor kinases, and receptor trafficking through the endocytic pathway. Once activated and phosphorylated, the receptors recruit and form a complex with β -arrestins that are thought to sterically hinder further coupling of the receptors with the heterotrimeric G proteins, thereby generating receptor desensitization through cessation of G protein-mediated signaling [7]. As adaptor molecules, β -arrestins link GPCRs to several proteins of the endocytic machinery, namely clathrin [8] and the clathrin adaptor complex AP-2 [9]. Although β -arrestins are thought to regulate the internalization and desensitization of many GPCRs, internalization of the formyl peptide receptor FPR is not dependent on the presence of β -arrestins [10]. This behavior was also observed for the protease activated receptor 1 (PAR1 or thrombin receptor) [11], thus defining a class of GPCRs that can be internalized in the absence of β -arrestins. Among chemotactic receptors, this could be a feature unique to FPR, since the chemoattractant receptor C5aR [12] and another chemotactic GPCR, CCR5 [13], internalize in a β -arrestin-dependent manner.

Beside their involvement in receptor endocytosis, β -arrestins now appear to act as signal transducers to connect the receptors with diverse signaling pathways within the cell. β -arrestins serve as adaptors that scaffold a broad spectrum of molecules in response to agonist stimulation of GPCRs [14,15]. In this line, β -arrestins have been demonstrated to bind components of mitogen-activated protein kinase (MAPK) cascades (ERK1/2, c-Jun kinase 3, and p38 MAPK), leading to their activation [14]. Thus, G protein-independent signaling pathways have emerged that require the formation of multi-component signaling complexes nucleated around the stimulated receptor and β -arrestins. Receptors that do not rapidly dissociate from β -arrestins internalize with them into endosomes for prolonged periods. The stable association of the receptor with β -arrestins stabilizes cytosolic phosphorylated ERK1/2 activity [16–18]. Such a β -arrestin-mediated process introduces an additional level to the complexity of the events leading from the seven membrane-spanning receptors to cell signaling pathways, including the activation of MAPKs [19]. G protein- and β -arrestin-mediated extracellular signal-regulated kinase (ERK) pathways seem spatially and temporally distinct. In the case of receptors coupled to the G_q or G_s classes of G proteins, such as the angiotensin II type 1A receptor ($AT_{1A}R$), the V2 vasopressin receptor (V2R), the parathyroid receptor PTH1R, and the β_2 -adrenergic receptor (β_2AR), blockade of the G protein-dependent signaling by protein kinase C (PKC) or protein kinase A (PKA) inhibitors reduces the early component of agonist-stimulated ERK activity [20–23]. However, these inhibitors of second messenger-dependent kinases have little effect on the later phase of agonist-stimulated ERK1/2 phosphorylation. This later phase of ERK1/2 activation is blocked by depletion of cellular β -arrestins by small interfering RNA. For several receptors, including the β_2AR , there seem to be a particular mechanism by which β -arrestins mediate signaling to ERK1/2 [24]. Phosphorylation of the β_2AR by cAMP-activated PKA switches its predominant coupling from stimulatory (G_s) to inhibitory (G_i) guanine nucleotide regulatory protein [25]. β -arrestins regulate this switch through the recruitment of PDE4D cAMP phospho-

diesterase that controls PKA activity [26–28]. Potential sites of cross-talk between the ERK and cAMP signaling systems, as well as feedback and feedforwards loops, have been considered [29].

A majority of leukocyte functions are abolished by pertussis toxin (PTX), which ADP-ribosylates the α subunit of the G_i class of G proteins [30]. The G_{i2} protein has been shown to be the major G protein that interacts with N-formyl peptide chemoattractant receptors [31]. Although G_{i16} , a protein of the G_q class, and G_z , a PTX-insensitive member of the G_i family of G protein, have been shown to couple to chemoattractant receptors in transfected cells, their role in leukocyte functions remain to be established [32,33]. Formyl peptide receptors regulate type II adenylate cyclase in transfected cells but they do not couple to G_s or G_q [34]. The exposure of neutrophils to chemoattractants increases the activities of MAPKs, including ERK1/2. Activation of MAPKs by chemoattractant receptors, that couple to PTX-sensitive G_i proteins, is transduced by $G\beta\gamma$ subunits [35]. However, a role for β -arrestins in the regulation of formyl peptide chemoattractant receptor signaling can also be envisioned.

In this paper, we investigated the role of β -arrestins in the ligand-induced FPRL1 internalization and signaling. Ligand-stimulated FPRL1 internalized and exhibited a sustained association with β -arrestins during prolonged endocytosis. FPRL1 internalization was compromised in β -arrestin-deficient cells, distinguishing FPRL1 from the prototypical formyl peptide receptor FPR [10]. Similar to FPR [36], FPRL1-mediated ERK1/2 activation was not regulated by β -arrestins and occurred primarily through G protein signaling.

2. Materials and methods

2.1. Cell lines and plasmids

HEK293 cells were obtained from American Type Culture Collection. Mouse embryonic fibroblasts (MEF) and MEF cell lines deficient in β -arrestin1 (MEF- β -arr1 $^{-/-}$), β -arrestin2 (MEF- β -arr2 $^{-/-}$) or both β -arrestins (MEF- β -arr1&2 $^{-/-}$) were kindly provided by Dr. R.J. Lefkowitz (Duke University Medical Center, Durham, NC). Cells were cultured at 37 °C in a humidified atmosphere with 5% CO₂ in Dubelcco's modified Eagle's/F12-GlutaMAX I medium supplemented with 100 U/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin and 10% heat inactivated foetal calf serum. Culture medium, serum and antibiotics were obtained from Invitrogen (Cergy Pontoise, France). HEK293 [37] and MEF [10] cells do not express N-formyl peptide receptors. Construction of the pEF-neo-FPRL1 plasmid [38] and of plasmids encoding β -arrestin1 or β -arrestin2 and β -arrestin1- or β -arrestin2-EGFP fusion proteins [12] have been previously described. A KpnI/PmeI DNA fragment encoding FPRL1 was also cloned in pEF6/Myc-HisC (Invitrogen), to obtain the pEF-bsd-FPRL1 plasmid. The pEF-PAC plasmid was kindly provided by Dr. M.C. Dinauer (Indiana University School of Medicine, Indianapolis, IN).

2.2. Transfection and generation of cell lines

HEK293 cells that stably express FPRL1 (FPRL1-HEK293) were obtained by transfecting cells with 20 μ g of the pEF-neo-FPRL1 plasmid. MEF cell lines stably expressing FPRL1 were obtained by transfecting cells with 20 μ g of the pEF-neo-FPRL1 plasmid and 1 μ g of the pEF-PAC plasmid in the case of MEF-wt and MEF- β -arr2 $^{-/-}$, or 20 μ g of the pEF-bsd-FPRL1 plasmid in the case of MEF- β -arr1 $^{-/-}$ and MEF- β -arr1&2 $^{-/-}$. DNA-mediated gene transfer was performed by electroporation as previously described [39]. Resistant clones were selected with either G418 (500 μ g/ml) and puromycin (1 μ g/ml), or blasticidin (10 μ g/ml). FPRL1 expressing clones were detected by fluorescence microscopy after immuno-staining of the surface-localized receptor, as

described below, on fixed and non-permeabilized cells. Clones were also assayed for receptor expression by testing their ability to bind ^{125}I -labeled WKYMVM peptide. Peptide iodination [40] and binding assay [41] were performed as previously described.

LipofectAMINE 2000® (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) was used for transient DNA transfections. Cells were grown to reach ~90% confluence and transfections were performed according to the manufacturer recommendation.

2.3. Fluorescence microscopy

FPRL1-HEK293 cells transiently expressing β -arrestin1-or β -arrestin2-EGFP fusion proteins were plated into polylysine-coated 8-chamber glass LAB-TEK® (Nalge Nunc International, Hereford, UK). FPRL1 expressing MEF cells were plated on polylysine-coated coverslips. Cells were stimulated with 100 nM of hexapeptide WKYMVM (synthesized and HPLC-purified by Neosystem,

Strasbourg, France) in RPMI 1640 (Life Technologies, Grand Island, NY) at 178 37 °C for various periods of time ranging from 0 to 45 min. HEK293 cells were 179 fixed with 3% paraformaldehyde in phosphate buffered saline (PBS) 180 supplemented with 2% sucrose for 30 min at room temperature, quenched 181 with 50 mM NH_4Cl in RPMI 1640 for 15 min and permeabilized with 0.1% 182 Nonidet P-40 for 10 min. MEF cells were fixed and permeabilized with 100% 183 acetone for 30 s at -20 °C. Fixed and permeabilized cells were incubated with 184 blocking buffer (2% bovine serum albumin (BSA) in RPMI 1640) for 30 min. 185 The receptors were labeled for 1 h at room temperature with an anti-FPRL1 186 antibody [40]. Cells were washed three times and incubated with red fluorescent 187 Alexa 568-conjugated goat anti-rabbit antibody (Molecular Probes, Eugene, 188 OR) for 30 min at room temperature. The small GTPase Rab11, a marker of the 189 perinuclear recycling endosome compartment, was visualized with anti-Rab11 190 antibodies (BD Biosciences Pharmingen, Erembodegem, Belgium) and green 191 fluorescent Alexa 488-conjugated goat anti-mouse antibody (Molecular Probes). 192

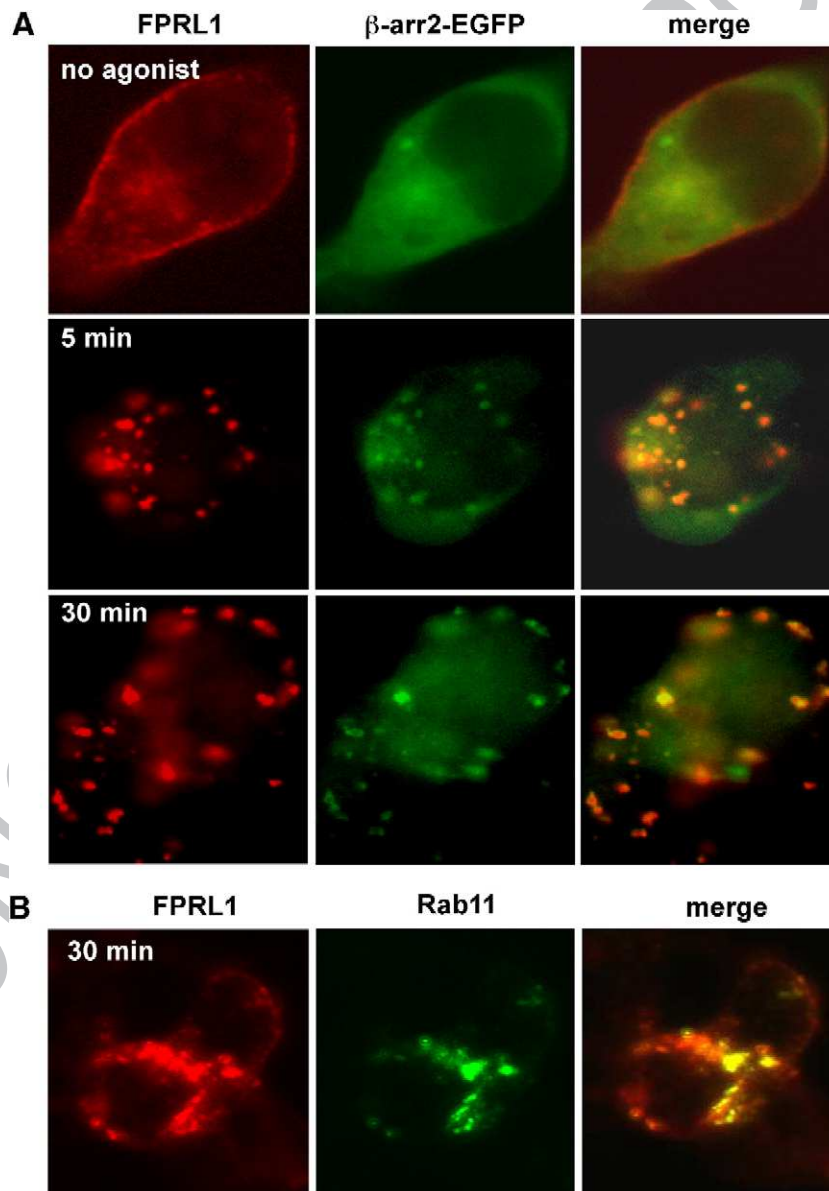


Fig. 1. Agonist-stimulated colocalization of FPRL1 with β -arrestin2-EGFP. A, HEK-293 cells stably expressing FPRL1 were transiently transfected to express a β -arrestin2-EGFP fusion protein. After treatment for indicated periods of time with 100 nM of the hexapeptide WKYMVM, cells were fixed, permeabilized, and stained as described under “Materials and methods”. Colocalization of FPRL1 and β -arrestin2-EGFP (β -Arr2-EGFP) is shown in the overlay images (right panels). B, HEK-293 cells stably expressing FPRL1 were treated for 30 min with 100 nM of the hexapeptide WKYMVM. Colocalization of FPRL1 with the marker of perinuclear recycling endosome, Rab11, is shown in the overlay image (right panels).

After washing, cells were embedded in anti-quenching medium DABCO (2.3% 1,4-diazabicyclo(2,2,2)octane, 50% glycerol, 10% of 0.2 M Tris HCl, pH 8.0, 0.02% Na₂S₂O₅). Fluorescence micrographs and layouts were performed using a Leica DMIRE2 inverse microscope equipped with a digital Leica DC350F camera using the QFluoro software (Leica Microsystems).

2.4. Internalization assay

The WKYMVM peptide iodination was performed as previously described [40]. MEF cells were seeded into polylysine-coated 6-well plates two days before the assay. Internalization assay was performed as previously described [12]. Briefly, internalization was initiated by adding ¹²⁵I-labeled WKYMVM peptide in RPMI containing 0.2% BSA and 20 mM Hepes, at 37 °C. At the indicated times, cells were washed twice and treated for 10 min with ice-cold acid buffer (150 mM NaCl, 200 mM acetic acid, pH 2.5) to remove ¹²⁵I-labeled peptide bound to cell surface receptors. Cells were lysed in 2 N NaOH and cpm were recorded in a gamma counter, thus giving a measure of peptide internalization/sequestration. The results are expressed as the percentage of specifically bound ¹²⁵I-labeled peptide that is sequestered using the following formula: (cpm resistant to acid wash)/(cpm specifically bound at 4 °C).

2.5. Preparation of cellular extracts and immunodetection of phosphorylated ERK1/2

FPRL1 expressing cells were serum-starved for 5 h, in the absence or presence of 100 ng/ml pertussis toxin (PTX) (Sigma, St. Louis, MO) prior to stimulation with the hexapeptide WKYMVM (100 nM) in RPMI 1640 for various periods of time at 37 °C. Cells were lysed in 2-fold Laemmli sample buffer and briefly sonicated. Proteins were separated by SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membrane for Western blotting. β -arrestins were detected with anti- β -arrestin1&2 antibody (A1CT, kindly provided by Dr. R.J. Lefkowitz) or anti- β -arrestin1 (K16) and anti- β -arrestin2 (H9) antibodies from Santa Cruz Biotechnologies (Santa Cruz, CA). Phosphorylated ERK1/2 and total ERK2 were detected by immunoblotting with anti-phospho-ERK1/2 (E4) and anti-ERK2 antibodies (C14) obtained from Santa Cruz Biotechnologies. Membranes were incubated with species-specific secondary antibodies conjugated to horseradish peroxidase and immunoblots were developed with enhanced chemiluminescence (ECL) detection system (Amersham Bioscience, Les Ulis, France). Phosphorylated ERK2 signals were quantified by densitometry using the ImageJ software (NIH, USA).

3. Results

3.1. The G protein-coupled receptor FPRL1 is associated with β -arrestins during endocytosis

Following stimulation, most G protein-coupled receptors (GPCRs) use a clathrin-dependent mechanism for internalization and recruit β -arrestins which act as adaptor molecules to key structural components of the clathrin-coated pits. It has been shown that the ligand-bound FPRL1 undergoes clathrin-mediated and dynamin-dependent endocytosis and recycles in a slow pathway involving perinuclear recycling endosomes [42].

We investigated if FPRL1 associates with β -arrestins and whether β -arrestins play a role in ligand-induced FPRL1 internalization. HEK293 cells that stably expressed FPRL1 were transfected to transiently express β -arrestin1-EGFP or β -arrestin2-EGFP fusion proteins. Fluorescence microscopy was used to detect β -arrestin-EGFP and immuno-decorated FPRL1 in fixed and permeabilized cells. As similar fluorescent patterns were obtained for both β -arrestin fusion proteins, only those concerning β -arrestin2-EGFP are presented in Fig. 1. In resting cells, FPRL1 was localized at the plasma membrane, as indicated by a thin red fluorescent staining at the cell periphery (Fig. 1A, upper panels). β -arrestin2-EGFP was evenly distributed throughout the cytoplasm. Merging the red and green signals indicated a complete absence of co-localization of FPRL1 and fluorescent β -arrestin2. Within 5 min after the addition of the synthetic peptide agonist WKYMVM (100 nM) the receptor localized as patches in the perinuclear region of the cytoplasm (Fig. 1A, middle panels). The β -arrestin2 green fluorescence matched these patches as indicated by the superimposition of the fluorescence images where a yellow color denotes co-localization. This pattern was maintained over the longest time point monitored, i.e. 30 min (Fig. 1A, lower panels). Internalized FPRL1 co-localized with the small GTPase Rab11, a

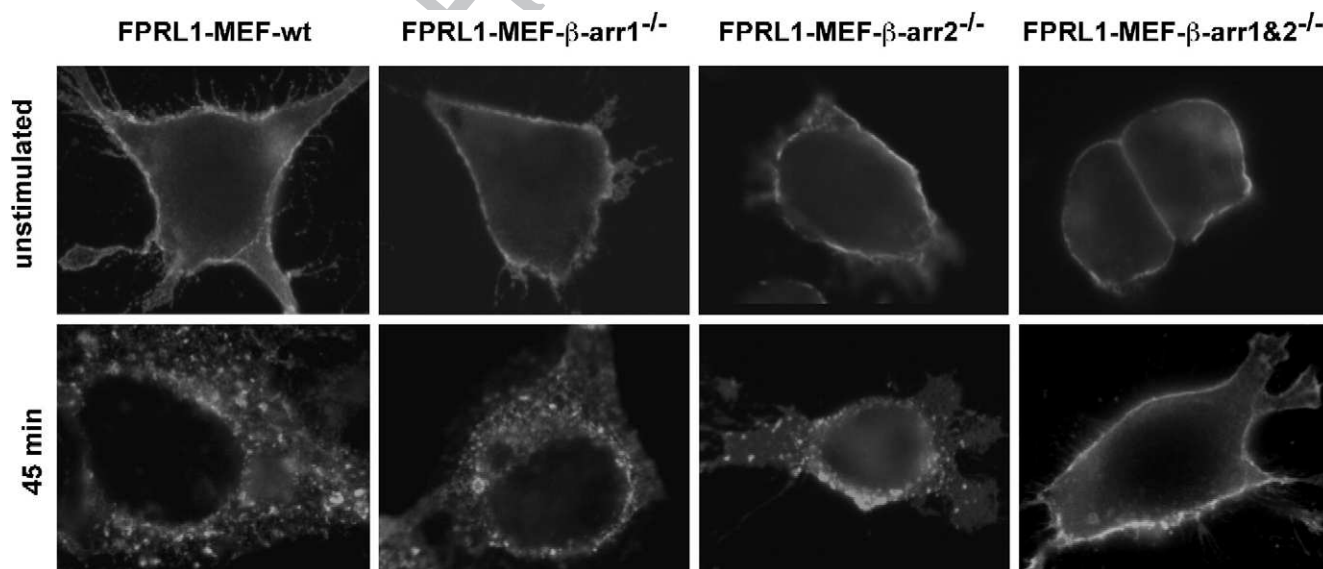


Fig. 2. Distribution of FPRL1 following agonist stimulation in wild type MEF and in MEF deficient in endogenous β -arrestins. FPRL1 was stably expressed in wild type MEF (FPRL1-MEF-wt), in MEF deficient in one of the two isoforms of β -arrestin (FPRL1- β -arr1^{-/-} or FPRL1- β -arr2^{-/-}) and in MEF deficient in both β -arrestins (FPRL1- β -arr1&2^{-/-}). Cells were treated with 100 nM WKYMVM for 0 and 45 min at 37 °C. Cells were fixed, permeabilized and stained as described under "Materials and methods". Primary antibody to FPRL1 followed by a secondary antibody conjugated to Alexa 568 were used to visualize the FPRL1.

marker of the perinuclear recycling endosome compartment (Fig. 1B). Thus, the two isoforms of β -arrestin are associated with FPRL1 throughout receptor endocytosis.

3.2. FPRL1 internalization is compromised in β -arrestin deficient cells

Previous studies have demonstrated that internalization of the β_2 -adrenergic receptor (β_2 AR) and the angiotensin II type 1A receptor ($AT_{1A}R$) is dramatically impaired in the absence of β -arrestins [43]. In contrast, studies of the PAR1 [11] and the FPR [10] demonstrated that internalization of these receptors was not dependent on the presence of β -arrestins.

To determine whether FPRL1 internalization was regulated by β -arrestins, FPRL1 was stably expressed in wild type mouse embryonic fibroblasts (MEF) or in MEF derived from mice for which β -arrestin1, β -arrestin2 or both β -arrestins had been deleted [43]. We stably expressed FPRL1 in these cell lines and we examined the ability of the receptor to undergo ligand-induced internalization. Immunofluorescence studies revealed that, upon stimulation, the receptor localized in intracellular vesicles throughout the cytosol as well as in a perinuclear compartment in wild type MEF expressing FPRL1 (FPRL1-MEF-wt) (Fig. 2, left panels). This pattern is similar to what was observed for FPR in the same cell type [10]. In the β -arrestin double knockout cells (FPRL1-MEF- β -arr1&2 $^{-/-}$), FPRL1 remained localized to the plasma membrane and was not internalized (Fig. 2, right panels). The absence of one or the other isoform of β -arrestin in FPRL1-MEF- β -arr1 $^{-/-}$ or in FPRL1-MEF- β -arr2 $^{-/-}$ cells (Fig. 2, middle panels) did not impair ligand-induced receptor internalization, indicating that either isoform can compensate for the lack of the other.

Ligand-induced internalization was quantified by assaying the capacity of FPRL1-MEF-wt and FPRL1-MEF- β -arr1&2 $^{-/-}$ cells to internalize 125 I-labeled WKYMVM ligand. As illustrated in Fig. 3, wild type cells were found to sequester 125 I-labeled WKYMVM peptide with a $t_{1/2}$ of ~10 min and a total of ~25% of the cell surface bound radiolabeled ligand being sequestered. β -arrestin double knockout cells showed a 4 fold reduction in 125 I-labeled ligand sequestration, indicating that β -arrestins are required for FPRL1 internalization.

3.3. Overexpression of β -arrestins has no effect on FPRL1-induced ERK1/2 activation in HEK293 cells

Beside their involvement in receptor endocytosis, β -arrestins have recently been shown to serve as signal transducers and adaptors for the scaffolding of a broad spectrum of molecules in response to agonist stimulation of GPCRs. These include the Src family kinases and components of the MAPK cascades [14,44–46]. ERK1/2 have been shown to be phosphorylated in response to FPRL1 stimulation by various agonists, including the hexapeptide WKYMVM [47,48]. In order to define the role of β -arrestins in the regulation of FPRL1-mediated ERK1/2 activation, we first used an overexpression approach. FPRL1 expressing HEK293 cells were transiently transfected with either β -arrestin1 or β -arrestin2. In Western blot analyses of

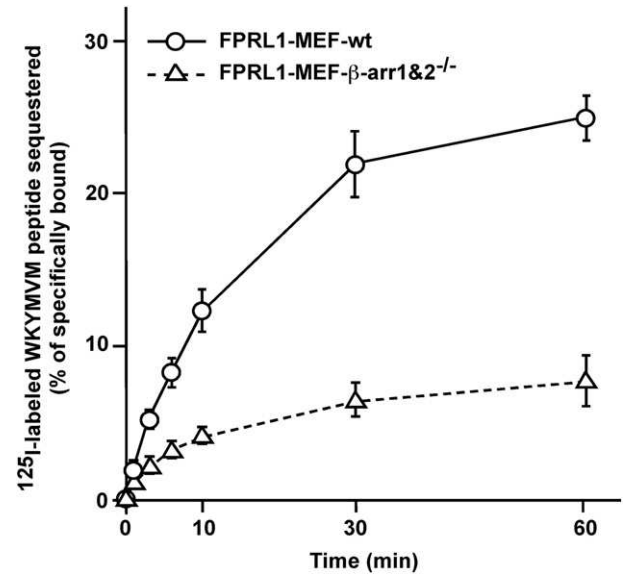


Fig. 3. Sequestration of radiolabeled FPRL1 agonist in wild type MEF and in MEF deficient in both β -arrestins. FPRL1-MEF-wt (open circles) and FPRL1-MEF- β -arr1&2 $^{-/-}$ (open triangles) were allowed to bind 125 I-labeled WKYMVM peptide at 4 °C, and the capacity to internalize surface bound ligand was assayed. After different periods of incubation at 37 °C, internalization was stopped by transferring cells into a chilled acid buffer to remove bound ligand that had not been internalized. Results are presented as the mean percentage \pm SE ($n=5$) of specifically bound 125 I-labeled peptide that was sequestered.

cell lysates, a robust expression was observed in β -arrestin1 or β -arrestin2 transfected cells while endogenous β -arrestins were barely detectable in cells transfected with an empty vector (mock) (Fig. 4B, inset). According to the current model, if β -arrestins function as scaffolds that facilitate receptor mediated ERK1/2 activation, overexpression of β -arrestins might be expected to increase agonist-mediated phosphorylation of ERK1/2. We thus compared agonist induced ERK1/2 phosphorylation in the presence or absence of β -arrestin overexpression. Two days after transfection, serum-starved cells were stimulated with 100 nM WKYMVM at 37 °C for various periods of time. Cell extracts were prepared and the phosphorylation of ERK1/2 was detected by protein immunoblotting using an anti-phospho-ERK1/2 antibody (Fig. 4A). To ascertain that the total level of ERK1/2 remained unchanged, the same blots were reprobed with an anti-ERK2 antibody that recognizes both phosphorylated and non phosphorylated forms. To confirm β -arrestin over expression in each sample, a fraction was assayed by protein immunoblotting with an antibody recognizing both β -arrestin1 and β -arrestin2. For the sake of clarity, these two sets of data are not presented in the figure. Nonetheless, the inset in Fig. 4B shows the levels of β -arrestin expression detected by Western blot in representative samples. Fig. 4B provides a quantitative assessment of the relative extent of phosphorylation of ERK2. In control FPRL1 expressing cells, the stimulation of the receptor by the hexapeptide resulted in a transient activation of ERK2. Phosphorylation of ERK2 increased rapidly, reaching a maximal level at 2.5 min of agonist treatment and decreasing to nearly basal level within 10 min. Neither the kinetics of FPRL1-mediated ERK1/2 activation nor the extent of phosphorylation of the kinases were significantly

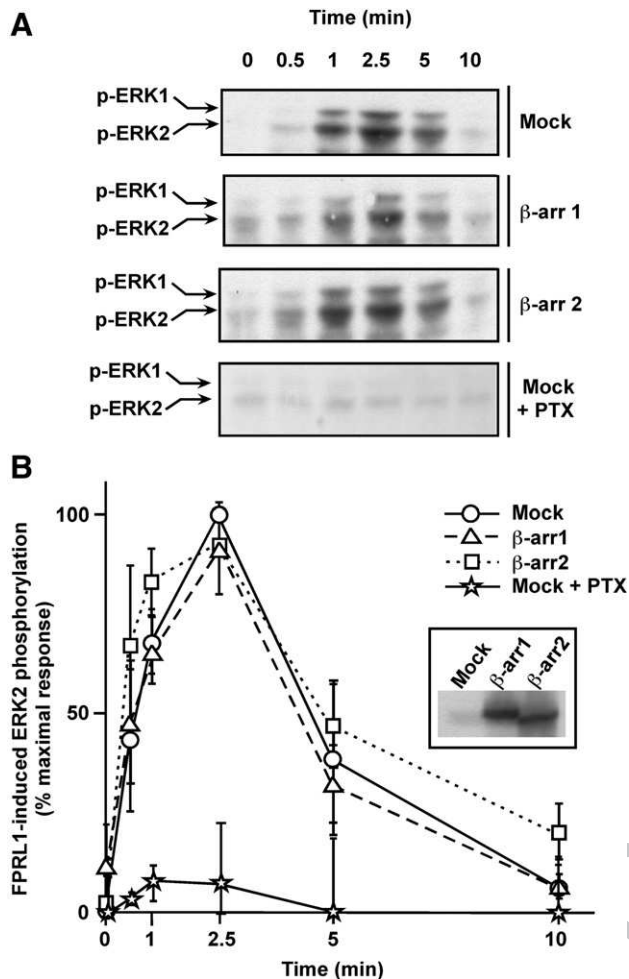


Fig. 4. Kinetics of FPRL1-mediated ERK1/2 activation in cells overexpressing β -arrestin1 or 2. HEK-293 cells expressing FPRL1 were transiently transfected with a β -arrestin1 or β -arrestin2 encoding plasmid or with an empty plasmid (mock). Two days after transfection, cells were serum-starved for 5 h followed by stimulation with the FPRL1 agonist peptide WKYMVM (100 nM) at 37 °C for the indicated periods. Mock transfected cells were treated or not with PTX (100 ng/ml) during the 5 h serum starvation. After stimulation, cell lysates were prepared as described under "Materials and methods". A, Phosphorylation of ERK1/2 was visualized by immunoblotting with anti-phospho-ERK1/2 antibody. These blots are representative of similar blots from 5 experiments. Western blot analyses with an anti-ERK2 antibody were performed to check that equal amount of ERK2 was present in each sample (not shown). B, phosphorylation of ERK2 was subsequently quantified by densitometry. The results were expressed in percent of maximum phosphorylation in control cells at 2.5 min of stimulation. Each data point represents the mean \pm S.E. from five independent experiments. The inset shows the levels of β -arrestin expression detected by Western blot with an antibody recognizing both β -arrestin1 and β -arrestin2.

An effect of β -arrestin overexpression on ERK1/2 activation might thus be concealed.

3.4. FPRL1-mediated ERK1/2 activation is not affected by the absence of β -arrestins

To define the role of β -arrestins in receptor signaling, we used the wild type MEF and MEF deficient in both endogenous β -arrestins that stably expressed FPRL1. In order to compare the signaling capacity of the two cell lines, receptor expression was assayed by the binding of 125 I-labeled WKYMVM at 4 °C. A level of receptor surface expression in the same range was found for FPRL1-MEF-wt ($750,000 \pm 60,000$ receptors per cell) and FPRL1-MEF- β -arr1&2 $^{-/-}$ ($550,000 \pm 70,000$ receptors per cell).

We compared ERK1/2 phosphorylation in FPRL1-MEF-wt and in FPRL1-MEF- β -arr1&2 $^{-/-}$ after stimulation of the receptor with the peptide WKYMVM (100 nM). FPRL1-mediated phosphorylation of ERK1/2 was visualized by immunoblotting. The right panels of xFig. 5 depict the quantification of the amount of phosphorylated ERK2. As shown in Fig. 5A in the control FPRL1-MEF-wt, stimulation of the receptor by the hexapeptide resulted in a rapid and transient increase of ERK2 phosphorylation that peaked at 2.5 min, with kinetics of return to basal level comparable to what was observed in FPRL1 expressing HEK293 cells (Fig. 4). The pattern of ERK1/2 activation was similar in the β -arrestin double knockout cells. These results indicate that β -arrestins are unlikely to play a role in the FPRL1-induced ERK1/2 activation.

3.5. FPRL1-mediated activation of ERK1/2 takes place primarily through G protein

In the same experiment, we investigated the relative part of G protein-and potential β -arrestin-dependent pathways in ERK1/2 activation by blocking the G_i -dependent FPRL1-mediated signaling pathways with pertussis toxin (PTX). PTX specifically ADP-ribosylates the α_i -subunit of the heterotrimeric G_i protein and prevents G_i protein-mediated signaling.

In a preliminary experiment (data not shown), FPRL1 expressing HEK293 cells transfected with a vector for transient expression of β -arrestin1- or β -arrestin2-EGFP were treated for 5 h with vehicle or 100 ng/ml PTX before stimulation of the receptor with WKYMVM (100 nM) for various periods of time. Fluorescence microscopy was used to detect β -arrestin-EGFP and immuno-decorated FPRL1. The fluorescence pattern was similar to what was observed with untreated cells. This indicated that PTX treatment did not impair β -arrestin interaction with FPRL1 or receptor internalization.

When FPRL1-MEF-wt cells were treated for 5 h with 100 ng/ml PTX before stimulation of the receptor, a residual ERK2 phosphorylation was observed, that represented $\sim 30\%$ of the maximum phosphorylation observed at 2.5 min in untreated cells (Fig. 5A). Similarly, $\sim 30\%$ of the maximum activation at 2.5 min was still present in cells lacking both isoforms of β -arrestin (Fig. 5B). A low level of ERK1/2 activity persisted after 5 min in FPRL1-MEF-wt, which was non-

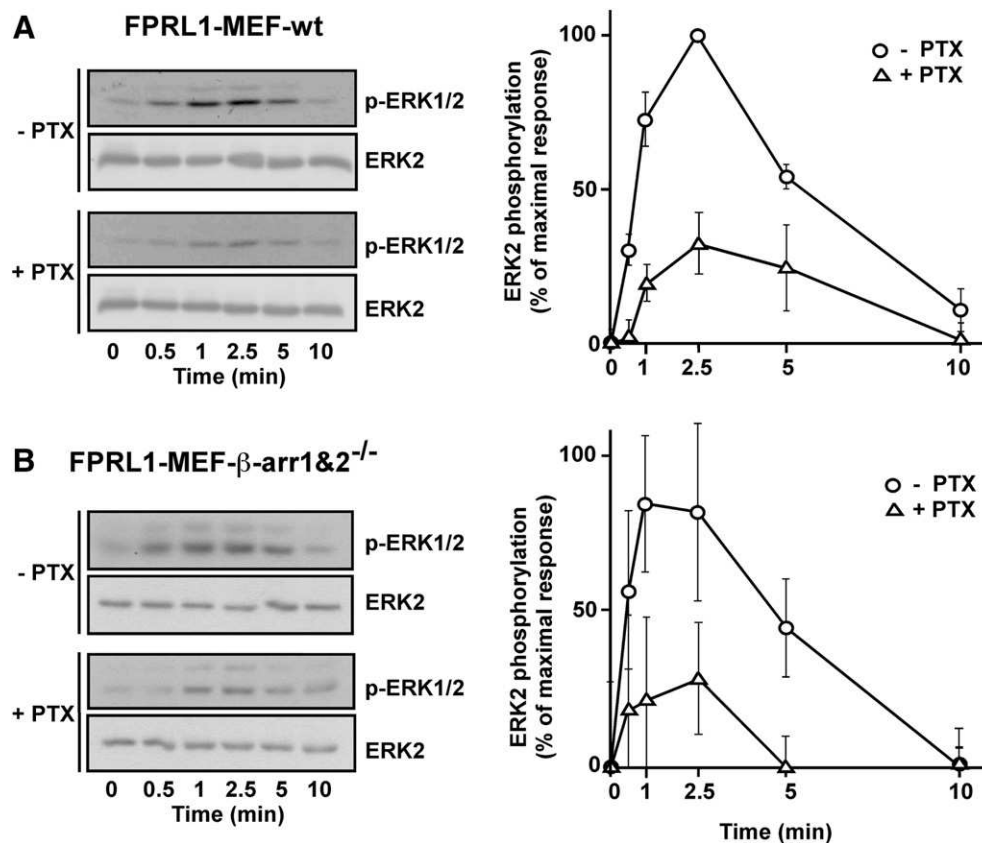


Fig. 5. FPRL1-mediated ERK1/2 activation in MEF. Wild-type MEF (A) and MEF deficient in endogenous β -arrestins (B) which stably express FPRL1. Both cell lines were serum-starved for 5 h in the absence (open circles) or presence (open triangles) of 100 ng/ml PTX. The receptor was then stimulated with 100 nM WKYMVM at 37 °C for indicated periods of time. In the left panels, phosphorylation of ERK1/2 was visualized by immunoblotting with anti-phospho-ERK1/2 antibody. Western blot analyses with an anti-ERK2 antibody were performed to check that equal amount of ERK2 was present in each sample. Presented blots are representative of similar blots from five experiments. In the right panels, the amount of ERK2 was quantified by densitometry and expressed as the percentage of the maximal ERK2 phosphorylation in cells not treated with PTX. Values in graphs represent the mean \pm S.E. from five independent experiments.

existent in cells deficient in both β -arrestins. A possible contribution of β -arrestins in the late phase of ERK1/2 activation might thus be considered. However, the PTX treatment readily eliminated FPRL1-mediated ERK2 activation in FPRL1-HEK293 cells (Fig. 4B). These cells constitutively express both isoforms of β -arrestin. Thus, the inhibition of ERK1/2 activation in FPRL1-HEK293 indicated that, in these cells, FPRL1-mediated activation of ERK1/2 takes place essentially through a heterotrimeric G_i protein. The incomplete inhibition of ERK1/2 activation by PTX in the MEF cell lines is likely to result from the partial coupling of the receptor to a heterotrimeric G protein other than G_i and insensitive to pertussis toxin.

4. Discussion

Although many of the most studied GPCRs internalize through clathrin-coated pits, some GPCRs are capable of utilizing alternative endocytic pathways. For instance, the prototypical chemoattractant receptor FPR has been shown to be internalized by clathrin- and dynamin-independent mechanisms in HEK293 cells [49]. In addition, several lines of evidence suggest that this receptor can be internalized through a β -arrestin-independent

process. The use of dominant-negative β -arrestin constructs [49] has shown that binding to arrestins is dispensable for the agonist-mediated FPR endocytosis. Partially phosphorylated FPR mutants that do not bind wild-type β -arrestins have been found to be efficiently internalized [50]. The extent and the rate of FPR endocytosis are not altered in transfected MEF derived from β -arrestin1 and β -arrestin 2 double knockout mice [10]. In contrast, the chemoattractant receptor FPRL1, which is highly homologous to FPR, primarily uses a clathrin-dependent endocytic pathway [42]. Conditions interfering with the formation of clathrin-coated pits, such as siRNA-mediated depletion of cellular clathrin and expression of a dominant-negative mutant of dynamin prevent agonist-triggered receptor internalization. We show in this paper that FPRL1 internalization is dependent on β -arrestins, as evidenced by the alteration of FPRL1 endocytosis in MEF deficient in both isoforms of β -arrestin. Receptor internalization occurred in MEF deficient in one or the other β -arrestin isoform, indicating that each β -arrestin isoform can compensate for the lack of the other.

Receptors that are internalized in a β -arrestin-dependent manner can be separated in two classes based on their ability to remain in complex with β -arrestins after they are internalized. After agonist binding, the class A receptors, which include the

β_2 AR, recruit β -arrestins but rapidly dissociate from the bound β -arrestins during internalization and recycle back to the cell surface shortly afterwards. In contrast, class B receptors, which include the vasopressin V2 receptor (V2R), the AT_{1A} R, and the C5a receptor (C5aR) internalize together with β -arrestins into endosomes where they remain stably associated [51,12]. The receptors are retained in endosomes for longer periods before undergoing recycling. FPRL1 can be classified as a class B receptor. The receptor co-internalizes with β -arrestins and associates with them throughout the endocytic process up to recycling endosomes.

It has also been demonstrated that the ability of β -arrestins to remain associated with GPCRs dictates the properties of GPCR resensitization. β -arrestin affinity for FPR is dependent on the receptor phosphorylation and β -arrestin variants display differential affinities for the phosphorylated FPR [52]. In addition, β -arrestins influence the fate of FPR by regulating its post-endocytic trafficking [10]. In cells where β -arrestins are present, the stimulation of FPR results in a translocation of β -arrestin1 from the cytosol to the membrane, and β -arrestin1 is seen to be associated with perinuclear endosomes containing internalized FPR [53]. In β -arrestin deficient cells, FPR is also directed to a perinuclear recycling compartment but it does not return to the plasma membrane. How β -arrestins regulate receptor recycling is unknown. Similarly, the ability of β -arrestins to remain associated with FPRL1 might regulate its dephosphorylation and ultimately the kinetics of its resensitization.

Chemoattractant receptors are coupled to heterotrimeric G proteins. Pertussis toxin (PTX) abolishes leukocyte functions, i.e. chemotaxis, degranulation, and superoxide production [30], thereby establishing that chemoattractant receptors are primarily coupled to G_i . In neutrophils, monocytes and differentiated HL-60 cells, a small PTX-resistant agonist-mediated activity is often observed that may result from the coupling of formyl peptide receptors to residual molecules of G_{16} , a promiscuous G protein of the G_q class, restricted to a subset of myeloid cells in the early steps of differentiation [54]. In co-expression systems formyl peptide receptors can also couple to G_z , a PTX-resistant member of the G_i family [33]. Here, we show that PTX treatment of HEK293 cells expressing FPRL1 readily eliminates receptor-mediated activation of ERK1/2. Thus, in HEK293 cells, FPRL1 appears to be exclusively coupled to a PTX sensitive G_i protein. We postulate that in β -arrestin-deficient MEF cells, the residual ERK1/2 activity observed after PTX treatment may be due to a partial coupling of FPRL1 to a PTX-resistant G protein, possibly one of the aforementioned. Because of its exclusive coupling to G_i , the chemoattractant receptor FPRL1 departs from β_2 AR which, in HEK293 cells, switches its coupling from a G_s to a G_i class of G protein [24]. As a matter of fact, the transient activation of ERK1/2 is triggered through a pathway that is sensitive to the G_i inhibitor PTX [26,28]. However, in a study performed in the same cell type, the dominant mechanism of β_2 AR-mediated activation of ERK1/2 does not involve a switch from coupling of G_s to G_i , but requires activation of a Src family kinase most likely by the classic G_s /adenylate cyclase /PKA pathway [55]. This may reflect differences in lines of HEK293 cells with regard to β_2 AR G protein coupling.

Upon chemoattractant binding, the $G\alpha_i$ subunit dissociates from the $\beta\gamma$ subunits which activates phospholipase $C\beta_2$, leading to the formation of inositol trisphosphates and diacylglycerol that cause the release of calcium from the intracellular calcium stores and activation of protein kinase C (PKC), respectively. Activation of other kinases are also intimately involved in chemoattractant signaling. The exposure of neutrophils to chemoattractants increases the activities of phosphatidyl inositol-3 kinase γ (PI3K γ) and mitogen-activated kinases (MAPKs), including extracellular signal-regulated kinases (ERK1/2). The pathway for ERK1/2 activation in myeloid cells has been reconstituted [35]. The G protein $\beta\gamma$ subunits recruit PI3K γ to the plasma membrane, thereby enhancing the activity of Src-like tyrosine kinases, which phosphorylate docking proteins, including the Shc adaptor protein. A functional association between Shc, Grb2 and SOS follows, leading to the activation of the Ras-Raf-MEK-ERK pathway. Recent evidence suggests that β -arrestins may contribute to GPCR signaling and regulate cellular signaling pathways by serving as multifunctional scaffold/adaptor proteins [56,57]. By binding to both c-Src and to agonist occupied β_2 AR, β -arrestins confer tyrosine kinase activity upon the receptor- β -arrestin complex [44]. Likewise, β -arrestins are involved in the recruitment of the Src family kinases, Hck and Fgr, to the CXCR-1 receptor in neutrophils [45]. Thus, β -arrestins may be involved directly in Src family kinase activation. β -arrestins also initiate the recruitment of mitogen-activated protein kinases, such as ERK1/2 [51]. They have been shown to form complexes with AT_{1A} R, MKK4 and JNK3 [58] or with protease activated receptor type 2 (PAR2), cRaf and ERK1/2 [16]. The simultaneous binding of both the first and third MAPK cascade components (for example c-Raf and ERK1/2) suggests that β -arrestins may serve to assemble the ERK signaling complex and to recruit the resulting kinase activity to the site of activated receptors. β -arrestin-mediated scaffolding and activation of MAPKs appear to be linked to the endocytosis of the receptor- β -arrestin complex. Class A receptors, such as β_2 AR, rapidly dissociate from bound β -arrestins and promote transient β -arrestin-mediated activation of ERK1/2 [18]. Class B receptors, such as AT_{1A} R and V2R, bind β -arrestins tightly and internalize with them into endosomal vesicles [51]. They are much more effective activators of the β -arrestin-scaffolded MAPK pathway, ERK1/2 activity persisting for prolonged periods of time [17,59]. β -arrestins have also been shown to ultimately regulate the subcellular localization of the active kinases and their distinct functions within the cell. Through complex formation, β -arrestins retain ERK1/2 in the cytosol to allow phosphorylation of cytosolic substrates. Meanwhile, this scaffolding protects activated ERK1/2 from dephosphorylation, thereby explaining the more sustained ERK1/2 activity observed with class B receptors. For example, ERK1/2 activation by PAR2 involves β -arrestins and scaffolded complexes that sequester the activated kinases in the cytosol [16]. Similar results are observed for AT_{1A} R and for V2R activation of ERK1/2 [17,18,51]. However, some receptors, such as the thrombin receptor PAR1 (structurally related to PAR2), do not require β -arrestins for activation of ERK1/2 [60]. Similarly, a recent study provides conclusive evidence that signaling through G protein is required for ligand-induced chemotaxis and is

essential for FPR-mediated activation of ERK1/2, while β -arrestins play a minor (if any) role in the activation of ERK1/2 through FPR [36].

In the present study, we investigated the relative part of the G protein- and β -arrestin-dependent pathways in FPRL1-mediated ERK1/2 activation. FPRL1 stimulation induced a rapid and transient ERK1/2 phosphorylation. A number of evidence led us to propose that the FPRL1-mediated signal transduction pathway leading to the ERK1/2 activation is mediated essentially through the heterotrimeric G protein and is not dependent on β -arrestins. Overexpression of each isoform of β -arrestin and, conversely, the lack of β -arrestins in deficient cells did not significantly modify either the kinetics of FPRL1-mediated ERK1/2 activation or the extent of phosphorylation of the kinase. The kinetics of ERK1/2 activation that we observed is reminiscent of the temporal pattern observed for ERK1/2 activation following $AT_{1A}R$ stimulation in HEK293 cells depleted in β -arrestin2 after transfection with siRNA [20]. In this case, down-regulation of β -arrestin2 expression, which leaves only the G protein-dependent ERK1/2 activation pathway, clearly shows distinct time course for G protein- and β -arrestin2-mediated ERK1/2 activation following stimulation of the receptor. The G protein-dependent ERK1/2 activation is rapid and transient while β -arrestin2-mediated activation is slower and more persistent. GPCRs that couple to PTX insensitive G proteins of the $G_{q/11}$ family (such as $AT_{1A}R$) mediate ERK1/2 activation predominantly via a PKC-dependent mechanism. The combination of β -arrestin2 siRNA transfection and blocking of G_q protein-mediated signaling to ERK1/2 by treatment with a PKC inhibitor eliminates $AT_{1A}R$ -mediated ERK1/2 phosphorylation [57]. Similarly, we treated FPRL1 expressing cells with PTX prior to FPRL1 stimulation. PTX treatment, which impairs signaling through the G_i type of heterotrimeric G proteins, inhibited FPRL1-mediated ERK1/2 phosphorylation. Taken together, our findings indicate that FPRL1, like the prototypical chemoattractant receptor FPR, also mediates activation of ERK1/2 preferentially through G protein and not through β -arrestins.

β -arrestin-mediated signaling has been observed essentially for receptors coupled to G proteins other than G_i , namely G_q and G_s . FPRL1 is the second example, after the prototypical chemoattractant receptor FPR [57], of a receptor coupled to a G_i protein that activates ERK1/2 independently of β -arrestins. We postulate that this β -arrestin-independent signaling may be a characteristic of G_i protein-coupled chemoattractant receptors.

5. Conclusions

The chemoattractant receptor FPRL1 appears to be internalized in a β -arrestin-dependent manner. In that, it differs from the other N-formyl peptide receptor, FPR, that can be efficiently internalized in the absence of β -arrestins. It can be classified as a class B receptor in terms of internalization because of its prolonged association with β -arrestins during endocytosis. However, it differs from the prototypical class B receptors, $AT_{1A}R$ and V2R, concerning the mode of signaling to MAPKs. FPRL1 signaling to ERK1/2 takes place primarily through G

protein and does not involve β -arrestins. β -arrestin-mediated signaling has been observed essentially for receptors coupled to G proteins other than G_i . FPRL1 is the second example, after the prototypical chemoattractant receptor FPR, of a receptor coupled to a G_i protein that signals to MAPKs independently of β -arrestins. This mode of signaling may thus be a characteristic of G_i protein-coupled chemoattractant receptors.

6. Uncited references

[4]
[21]
[22]
[27]

Acknowledgments

This work was supported by grants from the Commissariat à l'Energie Atomique (CEA), Centre national de la Recherche Scientifique (CNRS), and the University Joseph Fourier. E. Huet is a recipient of a fellowship from the CEA.

References

- [1] S. Fiore, J.F. Maddox, H.D. Perez, C.N. Serhan, *J. Exp. Med.* 180 (1994) 253.
- [2] R. Ye, F. Boulay, *Adv. Pharmacol.* 39 (1997) 221.
- [3] Y. Le, P.M. Murphy, J.M. Wang, *Trends Immunol.* 23 (2002) 541.
- [4] M. Durstin, J.-L. Gao, H.L. Tiffany, D. McDermott, P.M. Murphy, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 201 (1994) 174.
- [5] M.-J. Rabiet, E. Huet, F. Boulay, *Biochimie* (in press).
- [6] Y. Cui, Y. Le, H. Yazawa, W. Gong, J.M. Wang, *J. Leukoc. Biol.* 72 (2002) 628.
- [7] P.H. McDonald, R.J. Lefkowitz, *Cell. Signal.* 13 (2001) 683.
- [8] O.B. Goodman, J.G.J. Krupnick, F. Santini, V.V. Gurevich, R.B. Penn, A.W. Gagnon, J.H. Keen, J.L. Benovic, *Nature* 383 (1996) 447.
- [9] S.A. Laporte, R.H. Oakley, J.A. Holt, L.S. Barak, M.G. Caron, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 23120.
- [10] C.M. Vines, C.M. Revankar, D.C. Maestas, L.L. LaRusch, D.F. Cimino, T.A. Kohout, R.J. Lefkowitz, E.R. Prossnitz, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 41581.
- [11] M.M. Paing, A.B. Stutts, T.A. Kohout, R.J. Lefkowitz, J. Trejo, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 1292.
- [12] L. Braun, T. Christophe, F. Boulay, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 4277.
- [13] A. Fraile-Ramos, T.A. Kohout, M. Waldhoer, M. Marsh, *Traffic* 4 (2003) 243.
- [14] R.J. Lefkowitz, E.J. Whalen, *Curr. Opin. Cell Biol.* 16 (2004) 162.
- [15] S.K. Shenoy, R.J. Lefkowitz, *Biochem. J.* 375 (2003) 503.
- [16] K.A. DeFea, J. Zalevsky, M.S. Thoma, O. Dery, R.D. Mullins, N.W. Bunnett, *J. Cell Biol.* 148 (2000) 1267.
- [17] A. Tohgo, K.L. Pierce, E.W. Choy, R.J. Lefkowitz, L.M. Luttrell, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 9429.
- [18] A. Tohgo, E.W. Choy, D. Gesty-Palmer, K.L. Pierce, S. Laporte, R.H. Oakley, M.G. Caron, R.J. Lefkowitz, L.M. Luttrell, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 6258.
- [19] S.M. DeWire, S. Ahn, R.J. Lefkowitz, S.K. Shenoy, *Annu. Rev. Physiol.* 69 (2007) 483.
- [20] S. Ahn, S.K. Shenoy, H. Wei, R.J. Lefkowitz, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 35518.
- [21] X.R. Ren, E. Reiter, S. Ahn, J. Kim, W. Chen, R.J. Lefkowitz, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102 (2005) 1448.
- [22] D. Gesty-Palmer, M. Chen, E. Reiter, S. Ahn, C.D. Nelson, S. Wang, A.E. Eckhardt, C.L. Cowan, R.F. Spurney, L.M. Luttrell, R.J. Lefkowitz, *J. Biol. Chem.* 281 (2006) 10856.
- [23] S.K. Shenoy, M.T. Drake, C.D. Nelson, D.A. Houtz, K. Xiao, S. Madabushi, E. Reiter, R.T. Premont, O. Lichtarge, R.J. Lefkowitz, *J. Biol. Chem.* 281 (2006) 1261.
- [24] R.J. Lefkowitz, K.L. Pierce, L.M. Luttrell, *Mol. Pharmacol.* 62 (2002) 971.

- [25] Y. Daaka, L.M. Luttrell, R.J. Lefkowitz, *Nature* 390 (1997) 88.
- [26] G.S. Baillie, A. Sood, I. McPhee, I. Gall, S.J. Perry, R.J. Lefkowitz, M.D. Houslay, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100 (2003) 940.
- [27] G.S. Baillie, M.D. Houslay, *Curr. Opin. Cell Biol.* 17 (2005) 129.
- [28] M.J. Lynch, G.S. Baillie, A. Mohamed, X. Li, C. Maisonneuve, E. Klussmann, G. van Heeke, M.D. Houslay, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 33178.
- [29] M.D. Houslay, W. Kolch, *Mol. Pharmacol.* 58 (2000) 659.
- [30] G.M. Bokoch, *Blood* 86 (1995) 1649.
- [31] P. Gierschik, D. Sidoropoulos, K.H. Jakobs, *J. Biol. Chem.* 264 (1989) 21470.
- [32] T.D. Amatruda, N.P. Gerard, C. Gerard, M.I. Simon, *J. Biol. Chem.* 268 (1993) 10139.
- [33] R.C. Tsu, H.W.L. Lai, A.R.A., Y.H. Wong, *Biochem. J.* 309 (1995) 331.
- [34] R.C. Tsu, R.A. Allen, Y.H. Wong, *Mol. Pharmacol.* 47 (1995) 835.
- [35] M. Lopez-Illasaca, P. Crespo, P.G. Pellici, J.S. Gutkind, R. Wetzker, *Science* 275 (1997) 394.
- [36] J.M. Gripenberg, H.M. Miettinen, *Cell. Signal.* 17 (2005) 1300.
- [37] Y. Le, J. Hu, W. Gong, W. Shen, B. Li, N.M. Dunlop, D.O. Halverson, D.G. Blair, J.M. Wang, *J. Neuroimmunol.* 111 (2000) 102.
- [38] C. Dahlgren, T. Christophe, F. Boulay, P. Madianos, M.-J. Rabiet, A. Karlson, *Blood* 95 (2000) 1810.
- [39] J. Lang, F. Boulay, G. Li, C.B. Wollheim, *EMBO J.* 12 (1993) 2671.
- [40] T. Christophe, A. Karlsson, C. Dugave, M.J. Rabiet, F. Boulay, C. Dahlgren, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 21585.
- [41] L. Mery, F. Boulay, *J. Biol. Chem.* 269 (1994) 3457.
- [42] S. Ernst, N. Zobiack, K. Boecker, V. Gerke, U. Rescher, *Cell. Mol. Life Sci.* 61 (2004) 1684.
- [43] T.A. Kohout, F.S. Lin, S.J. Perry, D.A. Conner, R.J. Lefkowitz, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98 (2001) 1601.
- [44] L.M. Luttrell, S.S.G. Ferguson, Y. Daaka, W.E. Miller, S. Maudsley, G.J. Della Rocca, F.-T. Lin, H. Kawakatsu, K. Owada, D.K. Luttrell, M.G. Caron, R.J. Lefkowitz, *Science* 283 (1999) 655.
- [45] J. Barlic, J.D. Andrews, A.A. Kelvin, S.E. Bosinger, M.E. DeVries, L. Xu, T. Dobransky, R.D. Feldman, S.S. Ferguson, D.J. Kelvin, *Nat. Immunol.* 1 (2000) 227.
- [46] K.A. DeFea, Z.D. Vaughn, E.M. O'Bryan, D. Nishijima, O. Dery, N.W. Bunnett, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97 (2000) 11086.
- [47] T. Christophe, A. Karlsson, M.J. Rabiet, F. Boulay, C. Dahlgren, *Scand. J. Immunol.* 56 (2002) 470.
- [48] Y.S. Bae, J.C. Park, R. He, R.D. Ye, J.Y. Kwak, P.G. Suh, S. Ho Ryu, *Mol. Pharmacol.* 64 (2003) 721.
- [49] T.L. Gilbert, T.A. Bennett, D.C. Maestas, D.F. Cimino, E.R. Prossnitz, *Biochemistry* 40 (2001) 3467.
- [50] T.A. Bennett, T.D. Foutz, V.V. Gurevich, L.A. Sklar, E.R. Prossnitz, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 49195.
- [51] L.M. Luttrell, F.L. Roudabush, E.W. Choy, W.E. Miller, M.E. Field, K.L. Pierce, R.J. Lefkowitz, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98 (2001) 2449.
- [52] R.H. Oakley, S.A. Laporte, J.A. Holt, L.S. Barak, M.G. Caron, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 32248.
- [53] T.A. Bennett, D.C. Maestas, E.R. Prossnitz, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 24590.
- [54] J.F. Klinker, I. Schwaner, S. Offermanns, A. Hagelucken, R. Seifert, *Biochem. Pharmacol.* 48 (1994) 1857.
- [55] J. Friedman, B. Babu, R.B. Clark, *Mol. Pharmacol.* 62 (2002) 1094.
- [56] L.M. Luttrell, R.J. Lefkowitz, *J. Cell Sci.* 115 (2002) 455.
- [57] R.J. Lefkowitz, S.K. Shenoy, *Science* 308 (2005) 512.
- [58] P.H. McDonald, C.W. Chow, W.E. Miller, S.A. Laporte, M.E. Field, F.T. Lin, R.J. Davis, R.J. Lefkowitz, *Science* 290 (2000) 1574.
- [59] S. Ahn, C.D. Nelson, T.R. Garrison, W.E. Miller, R.J. Lefkowitz, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100 (2003) 1740.
- [60] R. Goel, P.J. Phillips-Mason, D.M. Raben, J.J. Baldassare, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 18640.

RESUME

Les cellules phagocytaires (neutrophiles, monocytes et macrophages) constituent la première ligne de défense contre les pathogènes. Leur migration dirigée vers le site infectieux et la libération de leur arsenal antimicrobien et cytotoxique sont l'aboutissement de voies de signalisation intracellulaires sollicitées par la stimulation de récepteurs appelés récepteurs de chimioattractants. Ces récepteurs appartiennent à la famille des récepteurs couplés aux protéines G hétérotrimériques (RCPGs). Après fixation du ligand et transmission du signal par la protéine G hétérotrimérique, les RCPGs sont phosphorylés et interagissent avec les β -arrestines, protéines d'échafaudage qui concourent au processus d'internalisation des récepteurs par la voie des puits mantelés de clathrine. Plusieurs exemples récents suggèrent qu'une signalisation indépendante des protéines G pourrait également être transmise par les β -arrestines et font émerger le concept de macro-complexes de signalisation capables d'assurer la spécificité des réponses cellulaires.

Le travail présenté dans ce mémoire concerne les récepteurs de la famille FPR (Formyl Peptide Receptor) et plus spécialement le récepteur FPRL1 (FPR-like 1).

Des peptides N-formylés dérivant de protéines du pathogène *Listeria monocytogenes* ou de protéines mitochondriales humaines ont été identifiés comme nouveaux agonistes de ces récepteurs. Les sélectivités relatives des différents récepteurs pour les peptides bactériens ou mitochondriaux assignent un rôle prédominant pour le récepteur FPR dans la défense antibactérienne et suggèrent un rôle des récepteurs de la famille FPR dans les phénomènes inflammatoires associés aux dommages tissulaires et aux maladies dégénératives.

La régulation des récepteurs dépend essentiellement de leur phosphorylation et de leur internalisation. Dans cette étude, il a été montré que le récepteur FPRL1 était phosphorylé sur des résidus sérines et thréonines. Pour cartographier les sites de phosphorylation, des mutants de remplacement Ser /Thr en alanine ont été construits par mutagenèse dirigée de la région C-terminale du récepteur. L'étude de leur phosphorylation a permis d'identifier les sites majeurs de phosphorylation. Il a été montré que les β -arrestines interagissent avec le récepteur FPRL1 phosphorylé et qu'elles sont indispensables à son internalisation. Ceci différencie le récepteur FPRL1 du récepteur FPR qui peut être internalisé même en l'absence des β -arrestines.

Par ailleurs, il a été montré par diverses approches (surexpression de formes sauvages ou de "dominants négatifs" des β -arrestines, utilisation de cellules déficientes en β -arrestines et inhibition par la toxine pertussique de la signalisation par les protéines G de type Gi) que l'activation rapide et transitoire des MAP kinases ERK1/2, enclenchée par la stimulation du récepteur FPRL1, est majoritairement dépendante de la protéine G hétérotrimérique et qu'il n'y pas de signalisation transmise par les β -arrestines. Cette propriété, que le récepteur FPRL1 partage avec le récepteur FPR, pourrait être une particularité des récepteurs de chimioattractants qui sont essentiellement couplés à des protéines G de type Gi.

Enfin, une analyse protéomique des complexes multi-protéiques bâtis autour du couple FPRL1/ β -arrestine a été menée. Après purification de la β -arrestine et des protéines associées par la méthode TAP (Tandem Affinity Purification), l'identification par spectrométrie de masse des protéines présentes a permis d'identifier un nouveau partenaire des β -arrestines qui interagirait avec celles-ci après stimulation du récepteur FPRL1. Il s'agit du complexe adaptateur AP3. Son homologue AP2 est impliqué dans l'internalisation par les puits mantelés de clathrine, mais peu de données existent concernant AP3. Une implication dans le trafic endocytaire ou post-endocytaire du récepteur peut être envisagée.